

**VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN  
ZUR HÄMOGLOBINSYNTHESE UND  
ZUR ZELLALTERUNG BEIM  
KERNHALTIGEN KARPENERYTHROZYTEN  
UND HUMANERYTHROZYTEN**

**DISSERTATION  
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)  
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III  
- BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN -  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**vorgelegt von**

**WERNER SPECKNER**

**aus FURTH i. WALD**

**1988**

01 28/59

Promotionsgesuch eingereicht am 10.2.1988

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. C. Albers  
Prüfungsausschuß:

Tag der mündlichen Prüfung:



# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung .....	1
2. Geräte, Materialien, Methoden .....	5
2.1. Abkürzungen .....	5
2.2. Geräte .....	6
2.3. Substanzen und Reagentien .....	7
2.4. Versuchstierhaltung und Blutgewinnung .....	10
2.5. Auftrennung von Human- und Karpfenerythrozyten nach Dichte und Alter und hämatologische Charakterisierung fraktionierter und unfraktionierter Zellen .....	13
2.5.1. Bestimmung von Hämatokrit, Erythrozytenzahl, Hämoglobinkonzentration und Plasmaosmolarität .....	13
2.5.2. Dichtefraktionierung .....	14
2.5.3. Bestimmung von Dichte, MCV, MCH, MCHC in Erythrozytenfraktionen .....	16
2.5.4. Mikroskop - Cytophotometrie .....	17
2.5.5. Markierung mit radioaktivem Glycin und $C^{14}$ - Bestimmung .....	19
2.5.6. Gelfiltration, IEF und Hämoglobinspaltung .....	20
2.6. Bestimmung von Enzymaktivitäten in fraktionierten und unfraktionierten Karpfen- und Humanerythrozyten .	23
2.6.1. Allgemeine Durchführung .....	23
2.6.2. Methoden der enzymatischen Bestimmungen .....	26
2.6.2.1. Acetylcholinesterase .....	26
2.6.2.2. Aspartat-Aminotransferase (GOT) .....	27
2.6.2.3. Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase .....	27
2.6.2.4. Peroxidase .....	28
2.6.2.5. Glutathion-Reduktase .....	28
2.6.3. Berechnung der Enzymaktivitäten .....	29
2.7. Statistik .....	30
3. Ergebnisse .....	31
3.1. Vorversuche (Ergebnisse zu 2.5.1.) .....	31

3.2. Dichte, MCV, MCH, MCHC in Erythrozytenfraktionen (Erg. zu 2.5.3.) .....	32
3.3. Hämoglobinabsorption von Einzelzellen per Mikroskop-Cytophotometrie (Erg. zu 2.5.4.) .....	36
3.4. Erythrozytenmarkierung in Abhängigkeit vom Zellalter beim Karpfen (Erg. zu 2.5.5.) .....	39
3.5. Erythrozytenmarkierung bei Humanblut (Erg. zu 2.5.5.)	47
3.6. Einbau von C <sup>14</sup> in Hämoglobin, Häm und Globin (Erg. zu 2.5.6.) .....	47
3.7. IEF von Karpfenblutfractionen (Erg. zu 2.5.6.) .....	52
3.8. Ergebnisse der enzymatischen Bestimmungen (zu 2.6.2.)	54
 4. Diskussion .....	 57
4.1. Dichtentrennung .....	57
4.2. Zellalter und Hämoglobingehalt .....	59
4.2.1. Blutzellbildung beim Fisch .....	59
4.2.2. Weiterbestehen der Hämoglobinsynthese im peripheren Karpfenerythrozyten in vivo .....	63
4.2.3. Korrelation Dichte - Alter des Erythrozyten und Glycinverwertung .....	65
4.2.4. Hämoglobinsynthese im Karpfenerythrozyten in vitro	69
4.3. Einflüsse auf die Zellalterung beim Humanerythrozyten	71
4.3.1. Die Verminderung der metabolischen Aktivität .....	71
4.3.2. Die Verminderung des reduktiven Potentials .....	76
4.3.3. Zellmembranveränderungen .....	78
4.4. Zellalter und Enzymaktivitäten beim Karpfen- und Humanerythrozyten .....	80
4.4.1. Acetylcholinesterase .....	80
4.4.2. Aspartat-Aminotransferase (GOT) .....	81
4.4.3. Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase .....	83
4.4.4. Peroxidase .....	83
4.4.5. Glutathion-Reduktase .....	84
4.5. Ausblick .....	85
5. Zusammenfassung .....	86
6. Literatur .....	89

## 1. EINLEITUNG

Seit der Beobachtung, daß Retikulozyten leichter als Erythrozyten sind, wurde generell angenommen, daß die Dichte von roten Blutzellen mit dem Zellalter anwächst. Zumindest für die oftmals untersuchten kernlosen Humanerythrozyten (Borun et al. 1957, Prankerd 1958, Rigas & Koler 1961, Garby & Hjelm 1963, Murphy 1973, Cohen et al. 1976) und ebensolche von verschiedenen Säugetieren (Kaninchen, Maus, Hund, Pferd, Schwein) (Hoffman 1958, Danon & Marikovsky 1964, Prentice & Bishop 1965, Bishop & Prentice 1966, Wilton 1966, Piomelli et al. 1967, Parker 1973, Abraham et al. 1978) wurde diese Beziehung mit Dichtefraktionierungen bestätigt, die sich somit zur Alterstrennung der Zellen anwenden ließen. Eine zu Säugererythrozyten analoge Dichte - Alter Korrelation wurde von Lane et al. (1982) für Forellenerythrozyten aus morphologischen Betrachtungen geschlossen, ist aber nicht gesondert weiterverfolgt worden.

Im Gegensatz zu den kernlosen Säugererythrozyten ist die reife rote Blutzelle aller anderen Wirbeltiere (Fische, Amphibien, Reptilien, Vögel) kernhaltig. Der Erythrozyt der Knochenfische stellt sich als eine relativ große, rund bis ovale Zelle mit zentral gelegenen Kern dar, der von einer Doppelmembran mit zahlreichen Poren umgeben ist (Yasuzumi & Higashizawa 1955, Fawcett & Witebski 1964, Kreutzmann & Jonas 1978). Er enthält u.a. Ribosomen, Endoplasmatisches Reticulum, Mitochondrien, Golgi-Apparat, Vakuolen (Weinreb 1963, Fey 1965b, Sekhon & Beams 1969, Yamamoto & Iuchi 1976) und könnte somit als ein methodisch einfach verfügbares Modell einer stoffwechselaktiven Somazelle angesehen werden, der er in Transportmechanismen und Stoffwechselvorgängen mehr ähnelt als ein Humanerythrozyt.

Will man nun den Alterungsvorgang dieser Zelle biochemisch und hämatologisch charakterisieren, ist eine reproduzierbare und effektive Auftrennung der Erythrozyten nach ihrem Alter eine wesentliche Voraussetzung für die beabsichtigten Untersuchungen.

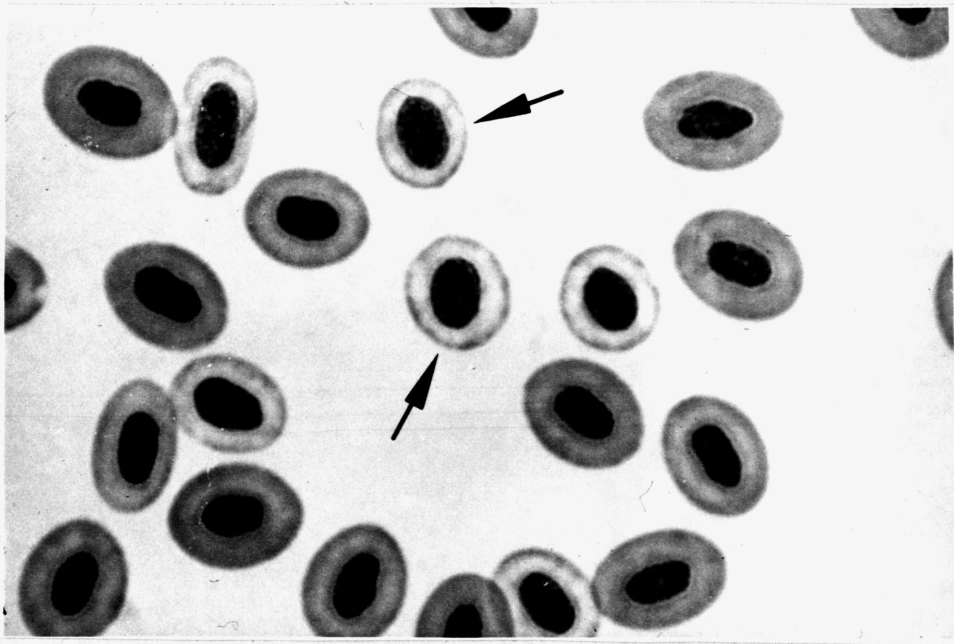


Abb. 1 : Reife und unvollständig entwickelte, hämoglobinarmer (Pfeil) Karpfenerythrozyten, die einige Tage nach Blutabnahme vermehrt auftreten (nach Pappenheimfärbung) (Albers 1985)

Wir beobachteten beim Karpfen 1-2 Wochen nach Abnahme einer größeren Menge Blut (20%-50% des Gesamtblutvolumens) das Auftreten einer besonderen Erythrozytenpopulation aus im Mikroskop rund und hell erscheinenden Zellen (Abb. 1), die sich im Hämatokritröhrchen zwischen dunkelroten Erythrozyten und weißen Leukozyten als eigene hellrot gefärbte Schicht absetzen. Daraufhin wurde zunächst getestet, ob sich die Beziehung Dichte - Alter auch für die kernhaltigen Erythrozyten des Karpfen nutzen läßt, um in Anlehnung an bisher beschriebene Trennverfahren in der Literatur eine Methode zu entwickeln, die sich generell zur altersabhängigen Auftrennung dieser Zellen eignet.



Die so erhaltenen Zellfraktionen sollten dann näher untersucht werden. Insbesondere wurde der bisher nicht gelösten Frage nachgegangen, ob die auffälligen morphologischen Besonderheiten der Karpfenerythrozyten während ihrer Lebensdauer zu biosynthetischen Aktivitäten genutzt werden, oder ob - wie bei Säugererythrozyten - lediglich unreife Vorstufen außerhalb des Kreislaufs biochemische Synthesen zeigen. Neben der Untersuchung der Hämoglobinsynthese in vitro und in vivo wurden in Abhängigkeit vom Zellalter einige Enzymaktivitäten bestimmt, die über ihre Beteiligung an Kohlenhydrat-, Protein- und Fettstoffwechsel Aussagen zu metabolischen Aktivitäten, Stoffwechselveränderungen und Alterungsvorgängen im Karpfenerythrozyten zulassen.

Im Einzelnen liegen dieser Arbeit folgende Zielsetzungen zu Grunde:

- 1.) Entwicklung und Testung einer reproduzierbaren, effektiven, möglichst einfachen Zentrifugationsmethode zur routinemäßigen Auftrennung von Karpfenerythrozyten nach ihrer Dichte,
- 2.) Bestimmung hämatologischer Basisparameter (Hämatokrit, Erythrozytenzahl, Hämoglobinkonzentration, MCV = Mittleres korpuskulares Volumen, MCH = Mittlerer korpuskularer Hämoglobingehalt, MCHC = Mittlerer korpuskularer Hämoglobinkonzentration) in Karpfenerythrozyten und deren Dichtefractionen und Vergleich mit Humanerythrozyten mittels Standardmethoden der klinischen Chemie und rechnergestützter Cytophotometrie,
- 3.) Untersuchung der Korrelation Erythrozytendichte - Erythrozytenalter in vivo mittels radioaktiver Markierung,

4.) Klärung der Fragestellung zum Hämoglobinstoffwechsel:  
"Findet im Karpfenerythrozyten im Gegensatz zum Humanerythrozyten in vivo im Blutkreislauf und in vitro Hämoglobinsynthese statt?",

5.) Einblick in den Kohlenhydrat-, Protein-, und Fettstoffwechsel mit damit verbundenen Membran- und Strukturveränderungen im Laufe der Zellalterung über beispielhafte altersabhängige Enzyme (Acetylcholinesterase, Aspartat-Aminotransferase, Peroxidase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Glutathion-Reduktase).



## 2. GERÄTE, MATERIALIEN, METHODEN

### 2.1. Abkürzungen

Hkt	= Hämatokrit
RBC	= Rote-Blutzell-Zahl
Hb	= Hämoglobin
MCV	= Mittleres korpuskulares Volumen (s. 3.2.)
MCH	= Mittlerer korpuskularer Hämoglobingehalt (s. 3.2.)
MCHC	= Mittlere korpuskulare Hämoglobinkonzentration (s. 3.2.)
SEM	= Standard error of fraction means (s. 2.7.)
LSD	= Least significant difference (s. 2.7.)
FG	= Freiheitsgrade
PSC	= Physiologische Salzlösung nach Imamura (1979); (s. 2.5.2.)
EDTA	= Ethylendiamin-tetraessigsäure
DTNB	= 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
GSH	= Glutathion (reduziert)
GSSG	= Glutathion (oxidiert)
AChE	= Acetylcholinesterase
GOT	= Aspartat-Aminotransferase (Glutamat-Oxalacetat- Transaminase)
G6PDH	= Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GRE	= Glutathion-Reduktase
POX	= Peroxidase
LDH	= Lactat-Dehydrogenase
MDH	= Malat-Dehydrogenase
Tris	= Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
USP	= United States Pharmacopoea

## 2.2. Geräte

Heparinisierte Glaskapillaren (Hawksley, Lancing Sussex U.K.)  
Micro-Haematokrit Reader (Hawksley, Lancing Sussex U.K.)  
Kunststoffspritzen 1 ml (Asik, Dänemark)  
Spezialkunststoffröhrchen (Krauth, Hamburg)  
Zellulosenitrat 1.2  $\mu$ m Filter (Millipore SM 11303 Sartorius, Göttingen)  
Mixer 5432 (Eppendorf, Hamburg)  
Thermostat 5320 (Eppendorf, Hamburg)  
Thermostat F 423 (Haake, Berlin)  
Magnet-Rührgerät (Heidolph, Kelheim)  
Schüttel- und Mischgerät (Heidolph, Kelheim)  
Microfuge HC 101 (Heraeus Christ, Osterode)  
Klein-Zentrifuge 3200 (Eppendorf, Hamburg)  
Zentrifuge IV-KS (Heraeus Christ, Osterode)  
Sorvall RC-2B Laborzentrifuge mit Rotor SS 34, SM 24 (Du Pont, Wilmington USA)  
Isomess IM 3000 Radio-Dünnschicht Analysator (Isomess, Straubenhardt)  
Halbmikro-Osmometer Type M (Knauer, Berlin)  
LKB 2117 Multiphor II Elektrophoreseeinheit (LKB, Gräfelfing)  
LKB 2103 Power Supply (LKB, Gräfelfing)  
Zeiss Scanning Cytophotometer 05  
Zeiss Ölimmersionsobjektiv Neofluar 100x/1.30  
Kondensor Plan 40x/0.60  
Zeiss Prismamonochromator M 4 Q III  
Osram Xenonhochdrucklampe XBO 150/W1  
Hamamatsu Multiplier 931 A  
Dietz 621 X 2 Minicomputer  
Coulter Counter D 1 (Coulter Electronics, Harpenden Herts, U.K.)  
Photometer LKB UltraSpec 4050 (LKB, Gräfelfing)  
Photometer 1101 M (Eppendorf, Hamburg)

Kompensationsschreiber 6511 (Eppendorf, Hamburg)  
pH Glaselektrode EaK 3-A (Eschweiler, Kiel)  
pH Referenzelektrode Ea 3-C (Eschweiler, Kiel)  
pH Glaselektrode (Ingold, Frankfurt)  
Mikroprozessor-pH-Meter Typ 34 (Knick, Berlin)  
Mikro-Ultrafiltrationssystem Modell 8 MC (Amikon, Witten)  
Tri-Carb-Oxidizer 306 (Packard, Illinois USA)  
Tri-Carb-Scintillation-Counter 300 C (Packard, Illinois USA)  
Olivetti PC M 24

### 2.3. Substanzen und Reagentien

Chemikalien und Reagentien wurden in der vorgeschriebenen Reinheit verwendet;

Lieferfirmen: BM = Boehringer Mannheim; Me = Merck;  
Ro = Roth; Se = Serva; Si = Sigma;

Aceton

Konz. Salzsäure (Me)

Natronlauge (Me)

m-Aminobenzoesäureethylester-methansulfonat (MS 222) (Sandoz)

Heparin-Na (Vetren<sup>R</sup>, Promonta)

Acriflavin (Se)

Ethacridinlactat (Se)

Kristallviolett (Se)

Methylenblau (Se)

Malachitgrün (Se)

Masoten<sup>R</sup> (Bayer)

Dimethylphthalat (Ro)

Dibutylphthalat (Me)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Guajacol (Ro)

Acetylthiocholinjodid (Se)  
 DNase I (Desoxyribonuclease) (Si)  
 DTNB (5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure) (Si)  
 EDTA (Ethylendiamin-tetraessigsäure-Dinatriumsalz) (Se)  
 NADPH- $\text{Na}_4$  ( $\beta$ -Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, red.)(BM)  
 NADH- $\text{Na}_2$  ( $\beta$ -Nicotinamid-adenin-dinucleotid, red.) (BM)  
 NADP- $\text{Na}_2$  ( $\beta$ -Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat) (BM)  
 ATP (Adenosin-5'-triphosphat) (BM)  
 GSSG (L-Glutathion, oxidiert) (Si)  
 Glucose-6-phosphorsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat (Me)  
 DL-Glutaminsäure (Si)  
 Pyridoxal-5-phosphat (Se)  
 Glutaraldehyd (Se)  
 2-Oxo-glutarsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat (Me)  
 L-Asparaginsäure-Mononatriumsalz-Monohydrat (Me)  
 Lactat-Dehydrogenase (LDH) (Susp. aus Kaninchenmuskel) (BM)  
 Malat-Dehydrogenase (MDH) (Susp. aus Kaninchenmuskel) (BM)  
 Natriumnitrit (Se)  
 Triton X 100 (Se)  
 Permafluor<sup>R</sup> (Packard)  
 Carbosorb<sup>R</sup> (Packard)  
 Rotiszint<sup>R</sup> (Ro)  
 Sephadex G-25 (Pharmacia)  
 Urografin<sup>R</sup> 76% (Schering)  
 Haemaccel<sup>R</sup> (Behring)  
 Macrodex<sup>R</sup> (Schiwa)  
 Röntgenschnellentwickler (Kodak)  
 X-ray screen blue base  
 Servalyt<sup>R</sup> precotes pH 5-8 T5 C3 (Se)  
 25% Rinderserumalbumin-lösung  
 Folin-Ciocalteu-Phenolreagens  
 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in 0.1 N NaOH  
 1% Natriumcitratlösung  
 0.5%  $\text{CuSO}_4$ -lösung



5% Glucoselösung

10 % Glucoselösung

0.1 M NaCl-Lösung

0.15 M NaCl-Lösung

0.2 M NaCl-Lösung

Physiologische Salzlösung nach Imamura (1979) (s. Tab. 2)

Isotonische Salzlösung nach Schindler et al. 1985 (s. Tab. 2)

Ringerlösung USP (s. Tab. 2)

Transformationslösung (s. 2.5.1.)

0.5 mM Phosphatpuffer pH 7.5

0.05 M Phosphatpuffer pH 7.2

0.1 M Tris/HCl-Puffer pH 7.4

0.1 M Tris/HCl-Puffer pH 7.8

0.1 M Tris/HCl-Puffer pH 8.0

1 mM Tris/HCl-Puffer pH 8.0

1 mM Tris/HCl-Puffer pH 8.3

#### 2.4. Versuchstierhaltung und Blutgewinnung

Die verwendeten Karpfen (*Cyprinus carpio* L., aus dem Teichwirtschaftsgebiet Wöllershof, ca. 1.5-2.5 kg) wurden mindestens 4 Wochen lang in einem 3000 l- Becken, versehen mit einem kontinuierlichen Wasserfluß (180 l/h), 12 h Hell-Dunkel Zyklus und Sauerstoffversorgung, bei 14°C - 16°C eingewöhnt. Bei Bedarf wurden zur Entfernung von Parasiten und Hautinfektionen in einer einmaligen Gabe bei Erhalt der Tiere folgende Lösungen zugesetzt: 0.09 mg Acriflavin, 0.09 mg Ethacridinlactat, 0.03 mg Kristallviolett, 0.06 mg Malachitgrün, 0.12 mg Methylenblau ad 1000 ml und 0.5 g/l Masoten<sup>R</sup> (Bayer). Die Karpfen erhielten proteinangereicherte Forellenfutterpellets (Silvercup-Mela). Blut wurde ihnen nach dem von Soivio et al. (1975) vorgestellten und Hughes et al. (1983) modifizierten Verfahren entnommen. Dazu wurde die Dorsalaorta punktiert und mit einem Dauerkatheter versehen (Abb. 2). Die Methode ist Grundlage zahlreicher Untersuchungen (Albers et al. 1981, Albers et al. 1983, Hughes et al. 1983, Albers 1985, Albers & Götz 1985, Schindler & de Vries 1986) und gewährt zusammen mit den standardisierten Bedingungen (spezielle Becken, Futter, circadianer Rhythmus, Temperatur) schnell und einfach die Gewinnung repräsentativer und reproduzierbarer Blutproben von lebenden Versuchstieren.

Als Kurzzeitanästhetikum während der Operation (Dauer ca. 10 Min.) diente 0.1 g/l MS 222 (Meta-amino-benzoesäureethyl-ester-methansulfonat, Sandoz). Die Karpfen wurden einen Tag vor der beabsichtigten Blutentnahme zu zweien in gut durchlüftete, temperierbare 60 l- Aquarien mit Frischwasserzufluß (10 l/h) und Hell-Dunkel Zyklus umgesetzt. Die Blutabnahme erfolgte in vorgekühlte Gefäße mit Heparinzusatz (30 I.U./ml Blut) und gelang normalerweise in wenigen Minuten ohne erkennbare Streßbelastung des Versuchstiers.





Abb. 2 : Röntgenaufnahme (60 kV, 30 mA, 5 s) nach Injektion von Röntgenkontrastmittel (Urografin 76% <sup>R</sup>, Schering) zur Veranschaulichung der Position des Dauerkatheters in der Aorta dorsalis des Karpfen (Hughes et al. 1983).

Zur Verhinderung der Blutgerinnung sowohl im Katheter wie beim Umgang mit Karpfen- und Humanblutproben diene jeweils Heparin (Vetren<sup>R</sup> Promonta).

Dies zum einen, um eine größtmögliche Übereinstimmung der Vorbehandlung von Karpfen- und Humanblutzellen zu erreichen. Hattingh (1975) und Smit & Hattingh (1980) bezeichnen Heparin als das Antikoagulans der Wahl für Fischblut (geringster Einfluß auf pH, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, Hkt, RBC, Hb-konzentration, MCV, MCH, MCHC, Plasmaproteine und Osmolarität, Elektrolyt-Laktat-, Glucose- und ATP-gehalt).

Zum anderen sind für Natriumcitrat und Natriumoxalat (Schrumpfung der Erythrozyten infolge pH- Verschiebung), EDTA ( $> 2 \text{ mg/ml}$  oder  $< 1 \text{ mg/ml}$  Membrandefekte und Größenveränderungen am Erythrozyten, 3rd Draft Standard for Specimen Collection, ECCLS, zitiert bei Behring-Werke 1984), sowie Ammoniumkaliumoxalat (hämolytische Wirkung, Smit & Hattingh 1980) ungünstige Effekte beschrieben.

Humanblut wurde, um unerwünschte Einflußgrößen und präanalytische Fehlermöglichkeiten bei der Probengewinnung so gut wie möglich auszuschließen, an ausgeruhten, männlichen Probanden (Alter 19 - 28 Jahre) im Liegen venös entnommen und mit Heparin als Antikoagulans ( $10 \text{ I.U./ml}$ ) versetzt. Entnahme von Kapillarblut ist hier wegen ungenügender Probenmengen, inkonstanter Blutzusammensetzung (Zellanreicherung, Austritt von Gewebeflüssigkeit, je nach Einstichstelle, -tiefe und Durchblutungsgrad) u.ä. Fehlerquellen gerade im Hinblick auf die Enzymaktivitätsbestimmungen ungünstig.

Da während längerer Probenaufbewahrung Hämolyse, Adhäsion der Zellen an der Wand, Verklumpung, Schrumpfung oder Schwellung der Zellen, Blutgerinnung, mikrobielle Kontamination etc. auftreten können, wurden alle Proben nach der Vorbehandlung bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert und innerhalb 24 h nach Entnahme verarbeitet bzw. als Hämolysat eingefroren.

## 2.5. Auftrennung von Human- und Karpfenerythrozyten nach Dichte und Alter und hämatologische Charakterisierung fraktionierter und unfraktionierter Zellen

### 2.5.1. Bestimmung von Hämatokrit, Erythrozytenzahl, Hämoglobinkonzentration und Plasmaosmolarität

Die hämatologischen Basisgrößen Hämatokrit (Hkt), Erythrozytenzahl (RBC) und Hämoglobinkonzentration wurden mit Standardmethoden der klinischen Chemie gemessen:

Hkt (1 Zellvolumen / 1 Blutvolumen, bzw. %) in heparinisierten Kapillarröhrchen mit Heraeus Christ (Osterode) Microfuge HC 101 (max. 20000 g) und Hawksley Micro-Haematokrit Reader (Lancing Sussex U.K.);

RBC (Mio. rote Blutzellen /  $\mu$ l Suspension) im automatisierten Verfahren per konduktometrischem Meßprinzip mit Coulter Counter Modell D (Coulter Electronics, Harpenden Herts U.K.) bei ausgetesteten und konstant gehaltenen Verdünnungsmedien (PSC, s. 2.5.2.; 0.15 M NaCl), Verdünnung (1:12500), Eichung und Geräteeinstellung.

Die Hämoglobinkonzentration mit der Haemiglobincyanid-Methode nach Betke & Savelsberg (1950), standardisiert von van Kampen & Zijlstra (1961), unter Verwendung von Transformationslösung (200 mg  $K_3Fe(CN)_6$ , 50 mg KCN, 1000 mg  $NaHCO_3$  ad 1000 ml), Eppendorf (Hamburg) Photometer 1101 M, Hg-Filter 546 nm. Wegen ausfallender DNA und ungenügenden Membranaufschlusses war bei resuspendierten und gewaschenen Karpfenerythrozyten die Zugabe von Triton X 100 (0.05 %) und DNase (10  $\mu$ g/ml) zur Transformationslösung und anschließende Zentrifugation bei 35000 g, 20 Min. (Sorvall RC 2B, SM 24) nötig. Reproduzierbare Meßwerte bei Vollblutproben vom

Karpfen erhielt man nach Filtration des Ansatzes (20  $\mu$ l Blut in 5 ml Transformationslösung) durch ein 1.2  $\mu$ m Zellulose-nitrat-Filter (Millipore SM 11303). Die Berechnung in (mmol/l) bzw. (g/dl) erfolgte mit dem Molekulargewicht 64500 und dem millimolaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon=11.0$  (van Kampen & Zijlstra 1961).

Aus diesen drei Basisgrößen lassen sich als hämatologische Grundparameter MCV, MCH und MCHC berechnen (s. 3.1., 3.2.)

Darüberhinaus wurde bei Karpfenplasmaproben und Salzlösungen die Osmolarität mit dem Halbmikroosmometer Typ M (Knauer, Berlin) durch Messung der Gefrierpunktserniedrigung ermittelt.

#### 2.5.2 Dichtefraktionierung

Plasma: Zellen gut aufschüttelbar, keine Hämolyse	
PSC: Zellen gut aufschüttelbar, keine Hämolyse	
0.9 % NaCl: bis zum 4. Waschen stabil, dann Hämolyse	
0.6 % NaCl: bis zum 4. Waschen stabil, dann Hämolyse	
1.2 % NaCl: Zellen bleiben stabil	
25 % Rinderserum-Albuminlsg.: leichte Hämolyse	
5 % Glucoselsg.: Klumpenbildung	
10 % Glucoselsg.: Klumpenbildung	
Macrodex <sup>R</sup> (isot. 6 % Dextranlsg.)	
oder Haemaccel <sup>R</sup> (isot. 3.5 % koll. Gelatinelsg.):	
schwer resuspendierbare Erythrozyten	
<hr/>	
Tab. 1 : Test (5-maliges Zentrifugieren von 1:6 verdünnten	
Karpfenerythrozyten bei ca. 5000 g, 20°C, 4 Min.) zur	
Eignung verschiedener Medien für die Dichtezentrifugation	



Plasma und buffy coat der Blutproben (i.a. 5 ml mit Heparinzusatz, s. 2.4.) wurden per Zentrifugation entfernt (Christ IV KS, Osterode, 900 g = max. Drehgeschw., 4°C, 10 Min.). Die Erythrozyten wurden je zweimal 5 Min. gewaschen. Vorversuche auf Eignung verschiedener Medien für Karpfenerythrozyten lieferten die in Tab. 1 geschilderten Ergebnisse.

Auf Grund dessen wurde in allen nachfolgenden Manipulationen (Zentrifugation, Waschen, Resuspendieren, Verdünnen) von Karpfenerythrozyten die an Imamura (1979) angepasste (pH 7.9, 275 mosm/l) physiologische Salzlösung (im folgenden kurz "PSC" genannt) verwendet (s. Tab 2).

A		B		C	
PSC = physiolog.		isot. Salzlsg. z.		Ringerlösung (USP)	
Salzlösung für		Cytophotometrie		z. Cytophotometrie	
Karpfenerythrozyten		von Karpfen-		v. Human-	
		erythrozyten		erythrozyten	
NaCl	141.1	NaCl	140.2	NaCl	147.5
KCl	1.43	KCl	4.0	KCl	4.0
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.99	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.5	CaCl <sub>2</sub>	2.25
NaHCO <sub>3</sub>	2.64	NaHCO <sub>3</sub>	3.6	NaHCO <sub>3</sub>	3.5
Glucose	6.16	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.5	290 mosm/l	
pH 7.9, 275 mosm/l		pH 7.9, 280 mosm/l			

Tab. 2 : Die generell verwendete physiologische Salzlösung für Karpfenerythrozyten (A: PSC, Imamura 1979), die isotonischen Salzlösungen zur Cytophotometrie für Karpfenerythrozyten (B: Schindler et al. 1985) und Humanerythrozyten (C: Ringerlösung USP), jeweils in mmol/l

Diese Lösung (PSC) erfüllt die Anforderungen an eine physiologische Salzlösung zum Universalgebrauch für Erythrozyten einer bestimmten Spezies (Lockwood 1961):

- essentielle Ionen in richtiger Osmolarität
- Pufferung und physiologischer pH-Wert
- Glucose als metabolisches Substrat
- Verwendbarkeit einer stabilen Stammlösung.

Für Humanerythrozyten wurde 0.15 M NaCl verwendet.

Die eigentliche Dichtezentrifugation der Erythrozyten erfolgte bei hohem Hkt (80 %) in langen, schmalen Spezialröhrchen (Länge 90 mm, Durchmesser 4 mm, Volumen 0.9 ml), die in eigens angefertigten Einsätzen in Sorvall RC 2B - SS 34 Rotoren (Du Pont, Wilmington USA) bei 20000 g und 15°C (Karpfenerythrozyten) bzw. 25°C (Humanerythrozyten) 40 Min. zentrifugiert wurden. Für das Einbringen der suspendierten Zellen in die Röhrchen und das an die Zentrifugation anschließende Resuspendieren zu 5 oder 6 gleichgroßen Fraktionen mit Hkt von ca. 40% wurden Kunststoffspritzen (1 ml, Asik Dänemark) mit 100 µl Glaskapillaren benutzt, in denen bereits ein Teil der Resuspensionslösung zum vorsichtigen Schütteln vorgelegt war.

### 2.5.3. Bestimmung von Dichte, MCV, MCH, MCHC in Erythrozytenfraktionen

In exemplarischen Kontrollversuchen wurde nach der Zentrifugation in allen Dichtefraktionen und in Resuspensionen von Erythrozyten aus Mischblut die Dichte mit diskontinuierlichen Gradienten aus 10 Mischungen von Dibutylphthalat ( $\rho = 1.046$  g/ml) und Dimethylphthalat ( $\rho = 1.189$  g/ml) (abgestuft zwischen 1.0869 g/ml und 1.1278 g/ml) bestimmt. Dazu wurde eine kleine Menge jeder Probe in separaten Kunststoffröhrchen (s. 2.5.2.) über diese Gradientenmischungen gelegt und 20



Min. bei 6000 g und 15°C (Karpfen) bzw. 25°C (Human) zentrifugiert, bzw. die Mikromethode nach Danon und Marikovsky (1964) mit Hämatokritröhrchen und Microfuge HC 101 durchgeführt, was zu vergleichbaren Werten führte.

MCV, MCH und MCHC wurden in den Fraktionen mit den gleichen Methoden wie in Mischblut (s. 2.5.1.) ermittelt.

#### 2.5.4. Mikroskop - Cytophotometrie

Die von Schindler et al. (1985) vorgestellte Mikroskop-Cytophotometrie erlaubt die Messung der Hämoglobinabsorption am einzelnen Erythrozyten.

Für diesen Versuch wurden die Karpfenblutproben in 6 Fraktionen getrennt: 5 gleich große und eine zusätzliche Fraktion, bestehend aus dem Anteil der sich nach 2 Wochen vorhergehender Abnahme von ca. 20 % des Blutvolumens ergebenden Zone hellrot gefärbter Zellen, die somit als eigene Population auf ihren Hb-gehalt hin bestimmt werden konnten. Die Humanblutproben wurden in 6 aliquote Teile getrennt.

Die Zellen wurden folgendermaßen fixiert: Drei Tropfen (Glaskapillare) der resuspendierten Fraktion bzw. der gewaschenen Erythrozyten aus Mischblut von Karpfen und Mensch wurden mit 0.5 % Glutaraldehyd in 5 ml isotonischer Salzlösung (s. Tab. 2) versetzt und 3 h bei 4°C leicht geschüttelt. Zur vollständigen Oxidation zu Methämoglobin wurde  $\text{NaNO}_2$  (10 mmol/l) zugesetzt. Nach Zentrifugation und viermaligem Waschen der Zellen mit 5 ml 0.5 mM Phosphatpuffer (pH 7.5) wurden die Suspensionen bei -80°C aufbewahrt.

Mit Hilfe eines Sprühkopfs wurden kleine Mengen dieser Proben bei gleichzeitiger Lufttrocknung fein auf Objektträger

verteilt und die Hämoglobinabsorption von je etwa 100, zufällig gewählten Zellen im Mikroskop-Photometer bei 411 nm (Soretbande;  $\Delta\lambda = 1.05$  nm) gemessen.

In den Versuchen von Schindler et al. (1985) erwies sich die hier gewählte Modifikation der Messung am trockenen Glutaraldehyd-Fixativ als verlässlichste Methode, weil Hämoglobinmodifikationen mit unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten, Einfluß von Suspensionslösung, pH-Wert und organischen Polyphosphaten auf die Absorptionswerte entfallen.

Folgende Geräte wurden benutzt: Zeiss scanning Cytophotometer 05, Zeiss Ölimmersionsobjektiv Neofluar 100x/1.30, Plan 40x/0.60 Kondensor, Zeiss Prismamonochromator M4 QIII, Osram Xenonhochdrucklampe XBO 150/W1, Hamamatsu Verstärker Type 931A, Dietz 621X2 Minicomputer.

Über diese Vorrichtung wurde jeder einzelne Erythrozyt in 0.5  $\mu\text{m}$ -Schritten bei einer Geschwindigkeit von 66 Schritten pro sec. abgetastet. Über das angegliederte Rechenprogramm wurde von der Summe der lokalen Absorptionswerte die Hintergrundabsorption subtrahiert. Nach Korrektur mikroskopiebedingter physikalischer Fehler (de Vries & Schindler 1984) wurde diese korrigierte Gesamttextinktion als Meßgröße (in arbitrary units, A.U.) gespeichert. Die Ausdrucksweise "willkürliche Einheit" besagt lediglich, daß damit keine bekannte, physikalisch definierte Einheit dargestellt ist; sie bietet auf Grund der einheitlichen und reproduzierbaren Ermittlungsweise eine exakte Größe zum Vergleich der Hämoglobinabsorption einzelner Zellen und der durch diese repräsentierten Fraktionen.

#### 2.5.5. Markierung mit radioaktivem Glycin und $C^{14}$ - Bestimmung

In der Absicht, mit diesem Langzeitversuch das Studium von stoffwechselbedingten Einflüssen auf die Erythropoiese zu verbinden, wurden 10 Karpfen in zwei Gruppen geteilt. Gruppe A bestand aus 5 Karpfen, die unter "Aktivbedingungen" gehalten wurden (Wassertemperatur: 20°C, Beckengröße: 430 l, Fütterung täglich ad libitum), Gruppe B aus 5 Karpfen unter "Reservebedingungen" (Wassertemperatur: 15°C, Beckengröße: 60 l für je 2 Fische, Fütterung 1x/10 Tage), diese Fische wurden nach 110 Tagen ebenfalls in Aktivbedingungen umgesetzt.

Von allen 10 Karpfen wurden jeweils 20 ml Blut entnommen. Nach Entfernung von Plasma, zweimaligem Waschen und Resuspendieren zum Ausgangs- Hämatokrit der jeweiligen Probe in PSC wurden die Erythrozyten mit 20  $\mu$ Ci 2- $C^{14}$ -Glycin (52 mCi/mmol, Amersham Braunschweig) bei 18°C 10 h lang unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal gewaschen, im jeweiligen Plasma resuspendiert und in die Dorsalaorta reinjiziert.

Im Laufe von 7 Monaten wurden in bestimmten Abständen (s. 3.4.) etwa 5 ml Blut pro Versuchstier entnommen und in je 5 nach Dichte getrennten Fraktionen die Radioaktivität (Tri Carb Sample Oxidizer 306, Tri Carb Scintillation Counter 300 D, Packard, Illinois USA) und RBC (Coulter Counter) bestimmt. Die Hb-haltigen Proben (ca. 100  $\mu$ l) wurden wegen des zu starken Geruchs bei direkter Flüssigkeits-Szintillationszählung auf Filterpapierkapseln verbrannt und  $C^{14}$  als  $^{14}CO_2$  gemessen (Carbosorb<sup>R</sup> als organische Base und Permafluor V<sup>R</sup> als Szintillationsflüssigkeit).

Analog markiert wurde eine Humanblutprobe:

- 10 ml, venös entnommen;
- zweimal gewaschen;

- inkubiert in Ringerlösung (s. 2.5.2., Tab. 2), angereichert mit 6 mmol/l Glucose, 10 h bei 37°C mit 5  $\mu$ Ci 2-C<sup>14</sup>-Glycin;
- dreimal gewaschen;
- in Plasma + 100 I.U. Heparin bei 4°C aufbewahrt;
- 2 Tage nach der Markierung erfolgte die Auftrennung in 5 Fraktionen und die Bestimmung von Radioaktivität und RBC in jeder Fraktion (wie oben geschildert).

#### 2.5.6. Gelfiltration, IEF und Hämoglobinspaltung

Zusätzlich zur Bestimmung der Radioaktivität in den fraktionierten Proben wurde verfolgt, ob C<sup>14</sup> in Hämoglobin, Häm und Globin eingebaut worden war.

Dazu wurden bei einem Karpfen, sofort nach in vitro-Inkubation mit Glycin ("HÄ CA") sowie 34 Tage nach erfolgter Reinjektion ("HÄ CB"), und bei der Humanblutprobe, sofort nach Inkubation ("HÄ HU"), ein Hämolysat einer kleinen Probe gewaschener Erythrozyten in 1 mM Tris/HCl Puffer (pH 8.3 mit 0.05 % DNase für Karpfenprobe bzw. pH 8.0 für Humanprobe) durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff hergestellt. Nach Zentrifugation bei 40000 g/ 10 Min. wurden die Hämolysate (Hb-gehalt ca. 5 g/dl) jeweils auf eine G 25-Sephadex Säule (Länge 40 cm, Durchmesser 2 cm) aufgegeben, mit 1 mM Tris/HCl Puffer, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.3 (Karpfenprobe) bzw. 8.0 (Humanprobe) bei 15 Tropfen/Min. eluiert und je 40 Tropfen automatisch gesammelt. In allen Gläschen wurden die Hämoglobinkonzentration (s. 2.5.1.) und die Radioaktivität (in den Hb-haltigen Gläschen wie unter 2.5.5. geschildert; in den ungefärbten Lösungen mit direkter Flüssigkeits-Szintillations-Messung in Rotiszint<sup>R</sup>) bestimmt.



Von einem zurückbehaltenen Teil von "HÄ CA" wurde nach Zentrifugation bei 40000 g/ 10 Min., Verdünnung mit 5 mM Tris/HCl Puffer pH 8.3 zu einem Hb-gehalt von ca. 0.2 g/dl und 10 minütiger Begasung mit CO (zur Verhinderung der Autoxidation) eine isoelektrische Fokussierung (IEF) in Anlehnung an Drysdale et al. (1971) unter aktualisierten Bedingungen mit Dünnschicht-Polyacrylamid-Gelen durchgeführt:

- Servalyt precotes pH 5-8, 125 x 125 x 0.15 mm, T5 C3 (Serva, Heidelberg);
- Elektrodenabstand 100 mm; Elektrodenlösungen: 40 mM DL-Glutaminsäure (Anode), 0.1 mM NaOH (Kathode);
- Auftragsmenge 5 µl; Auftragspunkt 30 mm von der Kathode;
- Temperatur 4°C (Haake T52 Thermostat);
- Vorfokussierungszeit 1 h, Fokussierungszeit 6 h;
- LKB 2117 Multiphor II Elektrophoreseeinheit (LKB, Gräfelfing); LKB 2103 Power Supply, eingestellt auf konstante Leistung von 1.5 W, maximale Spannung von 2 kV und maximale Stromstärke von 8 mA;
- Detektion per direkter Radiographie mit Isomess (Isotopenmeßgeräte Straubenhardt) sowie Autoradiographie mit X-ray screen blue base film und Röntgenschnellentwickler (Kodak).

In separaten Versuchen wurde bei 5 nicht markierten Karpfen in analoger Weise (mit Ausnahme der Isotopendetektion) eine IEF der Dichtefraktionen neben Mischblut durchgeführt.

Ein Teil des Karpfenbluthämolyats "HÄ CB" wurde gegen destilliertes Wasser dialysiert und ultrafiltriert (Mikro-Ultrafiltrationssystem 8MC, Amikon Witten). In dieser Lösung wurde Hämoglobin mit einem 20:1 (V/V) Überschuß von Aceton/0.2 M HCl-Lösung (tropfenweise Zugabe bei -20°C über 20 Min. und gelegentliches Rühren) nach der Methode von Rossi Fanelli et al. (1958) in Globin und Hämin gespalten. Das Präzipitat, 5 mal gewaschen mit kaltem Aceton/HCl (-20°C) und

gelöst in destilliertem Wasser, enthält Globin, das Filtrat Hämin in Aceton/HCl (Chlorhämin) (s. 3.6.).

Der Proteingehalt der Globinlösung wurde mit der Methode von Lowry (1951) bestimmt; Reagenzien: 0.5 %  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  und 1 % Natriumcitrat in  $\text{H}_2\text{O}$ , 2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in 0.1 N NaOH, Folin-Ciocalteu-Phenolreagens 1:1 mit  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt, Rinderserumalbumin als Standard; Messung bei 578 nm gegen Leerwertansatz mit dest. Wasser.

Im Filtrat wurde reines Chlorhämin durch Aufnahme eines Spektrums von 400 nm bis 650 nm (LKB Ultra Spec 4050, Gräfelfing) nachgewiesen (s. 3.6.).

In beiden Lösungen wurde die Radioaktivität (s. 2.5.5. und 2.5.6. oben) bestimmt.



## 2.6. Bestimmung von Enzymaktivitäten in fraktionierten und unfraktionierten Karpfen- und Humanerythrozyten

### 2.6.1. Allgemeine Durchführung

Gemäß der Michaelis-Menten Gleichung

$$v = k_e \cdot [E] \cdot \frac{[S]}{[S] + k_m}$$

$[S]$  = Substratkonzentration

$[E]$  = Enzymkonzentration

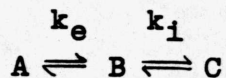
$k_e$  = Geschwindigkeitskonstante der Enzymreaktion

$k_i$  = Geschwindigkeitskonstante der Indikatorreaktion

$k_m$  = Michaelis-Konstante

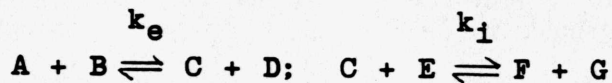
kann

a) eine Ein-Substrat-Reaktion



durch Wahl einer hohen Substratkonzentration ( $[A] \gg k_m$ ).

b) eine Zwei-Substrat-Reaktion



durch Einsatz des einen Substrats  $[A]$  in großem Überschuß i. V. zum anderen  $[B]$ , dessen Konzentration wiederum sehr hoch gegenüber seiner Michaelis-Konstante  $k_m$  gewählt wird,

in der Praxis zu einer Reaktion 1. Ordnung ( $v = [S] \cdot V_{\max}/k_m$ ) oder idealerweise zu einer Reaktion 0. Ordnung mit linearer Umsatzkurve ( $v = k \cdot [E] = v_{\max}$ ) gemacht werden.

Zusätzlich muß  $k_i \gg k_e$  sein, die nachgeschaltete Indikatorreaktion also wesentlich schneller ablaufen als die zu messende Enzymreaktion, so daß das Gleichgewicht so weit nach rechts verschoben wird, daß die Geschwindigkeit der Enzymreaktion nur noch von der Enzymkonzentration abhängt.

Zur exakten Messung der Enzymaktivität wäre es also vonnöten, das in der jeweiligen Zelle, Organ, Gewebe der untersuchten Spezies vorliegende Enzym in seinen physikochemischen und enzymkinetischen Eigenschaften vorher zu charakterisieren, soweit die benötigten Grundlagen aus der Literatur nicht entnommen werden können. Das bedeutet, daß für die Bestimmung der Aktivität jedes im Karpfenerythrozyten zu messenden Enzyms in enzymkinetischen Vorversuchen dessen Puffer-, pH- und Temperaturoptimum sowie die optimalen Konzentrationen der enzymhaltigen Präparationen, Substrate und Coenzyme zu ermitteln wären. Dies würde den Rahmen dieser Arbeit bei weitem sprengen. Da die genannten Parameter auch nicht aus den wenigen sich mit Karpfenerythrozytenenzymen befassenden Literaturquellen hervorgehen, wurden die Messungen unter folgenden Annahmen und Bedingungen standardisiert:

- die für die Enzymaktivitätsbestimmungen in Humanserum, -blut, oder -erythrozytenpräparationen angegebenen optimalen Bedingungen wurden für Karpfenproben übernommen. Zusätzlich wurde im Bereich von 1/10 bis zum Zehnfachen der angegebenen Probenmenge die Reaktion höchster Enzymaktivität und am besten auswertbarer  $\Delta E / \Delta t$ - Linearität gesucht und als Standardtestmethode beibehalten.
- soweit nicht anders angegeben, wurden die für die jeweiligen Humanenzyme empfohlenen Puffer für Karpfenenzymmessungen auf Tris/HCl-Puffer pH 7.8 abgeändert und die Temperatur von 25°C (allgemeiner Laborstandard) sowohl für Human- wie für Karpfenenzymmessungen beibehalten.
- Reagenzien und Enzyme wurden in der vorgeschriebenen Reinheit eingesetzt und gemäß allgemeinen Vorschriften (Bergmeyer 1974) verarbeitet und gelagert.

- Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte sofort nach Herstellung des Hämolysats bzw. - soweit keine Verminderung der Enzymaktivität beschrieben - nach Einfrieren bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

- Die Hämolysate wurden folgendermaßen hergestellt:

Nach Vorbehandlung, Fraktionierung und Resuspension

Verdünnen von Humanerythrozytensuspensionen in dest.  $\text{H}_2\text{O}$   
mit 0.5 mmol/l EDTA,

von Karpfenerythrozytensuspensionen in gleichen  
Teilen von PSC/DNase (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und Tris-HCl  
(1 mM, pH 8.0)/EDTA (0.5 mM) (+, wo beabsichtigt, Zusatz von 0.5 % Triton),

anschließendes dreimaliges Einfrieren und Auftauen in  
flüss. Stickstoff.

Wie bereits bei der Ermittlung der Hämoglobinkonzentration erwähnt, kommt es bei der Bereitung von Fischhämolysaten mit dest. Wasser zum Auftreten störender gelatineartiger Massen (Riggs 1981), was durch Hämolyse in physiologischer Salzlösung unter Zugabe von DNase eingeschränkt werden kann.

- Vor der Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte jeweils Präinkubation des Hämolysats für 10 Min. bei  $25^{\circ}\text{C}$ .

- Geräte: Eppendorf (Hamburg) Photometer 1101 M mit Spektralfilter Hg 366 nm, Hg 437 nm, Hg 405 nm und temperierbarem Küvettenhalter (Haake Thermostat F423, Berlin); Eppendorf Kompensationsschreiber 6511 mit regulierbarer Geschwindigkeit und Extinktionswertskala.

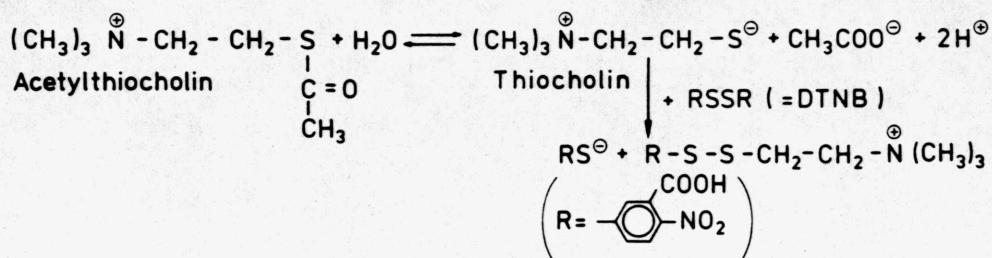
### 2.6.2. Methoden der enzymatischen Bestimmungen

Die folgende Auflistung zeigt die Meßansätze für die Bestimmung von Acetylcholinesterase, Aspartat-Aminotransferase (GOT), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Peroxidase und Glutathion-Reduktase, einschließlich der Endkonzentrationen der Reagenzien im Test (mmol/l), des Probenvolumens (ml) und des Gesamtvolumens in der Küvette (ml).

#### 2.6.2.1. Acetylcholinesterase (AChE)

Testansatz für	Human-	Karpfen - Enzym
Tris/HCl-Puffer pH 7.4	48.0 mmol/l	
Tris/HCl-Puffer pH 7.8		48.0 mmol/l
Acetylthiocholinjodid	2.5/5.0 mmol/l	2.5/5.0 mmol/l
DTNB	0.25 mmol/l	0.25 mmol/l
Hämolysat(1:10)/Plasma(1:4)	0.02/0.02 ml	
Hämolysat (1:4)/Plasma		0.1/0.02 ml
Ansatzvolumen	3.12 ml	3.2/3.12 ml

(Quelle: Bergmeyer 1974, Methode nach Ellmann et al. 1961)



**Abb. 3 : Meßprinzip der AChE-Bestimmung nach Ellmann**



### 2.6.2.2. Aspartat-Aminotransferase (GOT)

Testansatz für	Human-	Karpfen - Enzym
Tris/HCl-Puffer pH 7.8	80.0 mmol/l	80.0 mmol/l
Pyridoxalphosphat	0.1 mmol/l	0.1 mmol/l
L-Aspartat	200.0 mmol/l	200.0 mmol/l
$\alpha$ -Ketoglutarat	12.0 mmol/l	12.0 mmol/l
NADH	0.18 mmol/l	0.18 mmol/l
LDH	>1.2 U/ml	>1.2 U/ml
MDH	>0.6 U/ml	>0.6 U/ml
Hämolysat (1:1)	0.2 ml	0.2 ml
Ansatzvolumen	3.13 ml	3.13 ml

(Quelle: IFCC Section 1977)

#### Meßprinzip:

$\alpha$ -Ketoglutarat + L-Aspartat  $\rightleftharpoons$  Glutamat + Oxalacetat

Als Indikatorreaktion dient:

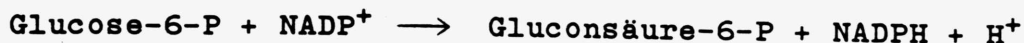
Oxalacetat + NADH +  $H^+$   $\rightarrow$  Malat +  $NAD^+$

### 2.6.2.3. Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH)

Testansatz für	Human-	Karpfen - Enzym
Tris/HCl-Puffer pH 7.8	88.9 mmol/l	88.9 mmol/l
EDTA	1.19 mmol/l	1.19 mmol/l
$MgCl_2$	6.30 mmol/l	6.30 mmol/l
NADP	0.71 mmol/l	0.71 mmol/l
G-6-P	0.95 mmol/l	0.95 mmol/l
Hämolysat (1:1)	0.05 ml	0.05 ml
Ansatzvolumen	2.25 ml	2.25 ml

(Quelle: Bergmeyer 1974, Beutler 1975)

**Meßprinzip:**



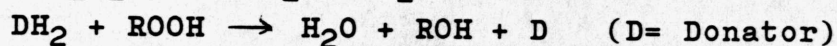
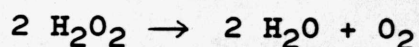
Anm: Bei der Berechnung wurde der WHO-Standard lt. Beutler (1975) zurgrundegelegt (Umsatz von 1 Mol  $\text{NADP}^+$  trotz möglicher Weiterreaktion von Gluconsäure-6-P mit  $\text{NADP}^+$  über 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase).

**2.6.2.4. Peroxidase (POX)**

Testansatz für	Karpfen - Enzym
-----	-----
Tris/HCl-Puffer pH 7.8	88.9 mmol/l
$\text{H}_2\text{O}_2$	0.55 mmol/l
Guajacol	8.96 mmol/l
Hämolytat in Transformationslösung (1:10)	0.05 ml
Ansatzvolumen	2.25 ml

(Quelle: Maehly & Chance 1964)

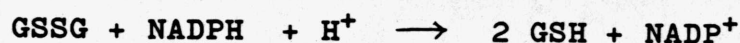
**Meßprinzip:**



Das Gujacol-Dehydrogenierungsprodukt ist chemisch nicht eindeutig definiert.

**2.6.2.5. Glutathion-Reduktase (GRED)**

**Meßprinzip:**



Testansatz für	Human-	Karpfen - Enzym
-----	-----	-----
Tris/HCl-Puffer pH 8.0	87.0 mmol/l	87.0 mmol/l
EDTA	1.17 mmol/l	1.17 mmol/l
NADPH	0.26 mmol/l	0.26 mmol/l
GSSG	3.55 mmol/l	3.55 mmol/l
Hämolysat (1:1)	0.05 ml	0.05 ml
Ansatzvolumen	2.30 ml	2.30 ml

(Quelle: Bergmeyer 1974)

### 2.6.3. Berechnung der Enzymaktivitäten

Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Berechnung der Enzymaktivitäten durch graphische Auswertung der  $\Delta E / \Delta t$ -Geraden und Verwendung der folgenden Formel:

$$\text{I.U./l Probenlsg.} = \frac{\Delta E \cdot 10^6 \cdot V}{\text{Min} \cdot \epsilon \cdot d \cdot v}$$

$\epsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient [ $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]

- Soweit der optische Test verwendet, wurden die von Bergmeyer (1975) angegebenen Extinktionskoeffizienten für NADH und NADPH bei 366 nm ( $3.4 \cdot 10^3$  bzw.  $3.5 \cdot 10^3$ ) eingesetzt.

- zur AChE-Bestimmung:  $\epsilon$  (405 nm) =  $13.3 \cdot 10^3$

- zur POX-Bestimmung:  $\epsilon$  (436 nm) =  $25.5 \cdot 10^3$

$\Delta E$  = Absorptionsänderung

$d$  = Schichtdicke [cm]

$V$  = Meßansatzvolumen [ml]

$v$  = Probenvolumen (Hämolysat, Plasma, Vollblut) [ml]

Wie aus den Messungen hervorging (s. 3.2.), ändern sich beim Karpfen die hämatologischen Parameter MCV, MCH und MCHC, beim Menschen MCV, MCHC, aber nicht MCH regelmäßig mit der Dichte der Erythrozyten. Daher wurden die Enzymaktivitäten bei Karpfenerythrozytenfraktionen auf die Zellzahl (als I.U./ $10^{12}$  bzw.  $10^9$  Zellen) berechnet, bei Humanerythrozytenfraktionen als geläufige Einheit I.U./gHb wiedergegeben.

## 2.7. Statistik

Soweit die Daten als Mittelwerte in den Abbildungen und Tabellen wiedergegeben sind, wurden die Unterschiede mit folgenden Tests (Sachs 1984) auf Signifikanz geprüft:

1.) die doppelte Varianzanalyse mit Angabe des F-Werts (mit Freiheitsgraden FG und Irrtumswahrscheinlichkeit p), der Streuung der Fraktionsmittelwerte (standard error of fraction means,  $\pm$  SEM) und des kleinsten signifikanten Unterschieds (least significant difference, LSD) nach R. A. Fisher mit  $p = 0.05$ ;

2.) die multiple Regressionsanalyse zur Bestätigung der Unterschiede und der Korrelation zwischen den Fraktionsmittelwerten mit Angabe des multiplen Korrelationskoeffizienten R.

Das zu den F-Werten gehörenden Signifikanzniveau wurde mit dem Algorithmus 8.9 von Cooke et al. (1982) auf einem PC (Olivetti M24) berechnet.

Die entsprechenden Werte und Signifikanzschranken sind aus den Tabellen und Bildlegenden zu entnehmen.



### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Vorversuche (Erg. zu 2.5.1.)

Die Ergebnisse der Vorversuche zur Ermittlung hämatologischer Grundparameter zeigt Tab. 3.

Parameter	Einheit	n	XM	± S.D.
Plasmaosmolarität	mosm/l	8	274.4	4.34
Hämatokrit (Hkt)	%	45	22.00	4.88
Ery.-Zahl (RBC)	Mio/ $\mu$ l	45	1.22	0.26
Hämoglobinkonz.	Hb <sub>4</sub> mmol/l	45	0.96	0.24
	g/l	45	62.11	14.78
MCV	$\mu$ m <sup>3</sup>	45	182.15	19.85
MCH	pg	45	50.53	6.07
MCHC	g/l	45	278.60	23.89
	Hb <sub>4</sub> mmol/l	45	4.32	0.37
Tab. 3 : Standardparameter von Karpfenblut (n = Anzahl der Karpfen)				

Hier weist die interindividuelle Bandbreite physiologischer und hämatologischer Basisgrößen, z.B. Hkt, RBC, Hb-konz., bereits auf die Anpassungsfähigkeit des Karpfen an Veränderungen seiner Umweltbedingungen hin (Lebensraum, Jahreszeit, Nahrungsangebot, Temperatur, Gaspartialdrücke, pH-Wert, Stress). Bei Fischen sind solche Adaptionsvorgänge vielfach bekannt (Smith et al. 1952, Dombrowski 1953, Murachi 1959, Srivastava 1968, Blaxhall & Daisley 1973, Weinberg et al. 1973, Johansson et al. 1974, Saez et al. 1982, Hughes et al. 1983, Onate et al. 1987). Eine nähere Diskussion in diesem Zusammenhang bietet der Glycineinbau-Versuch unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen (s. 3.4., 3.6.) an.

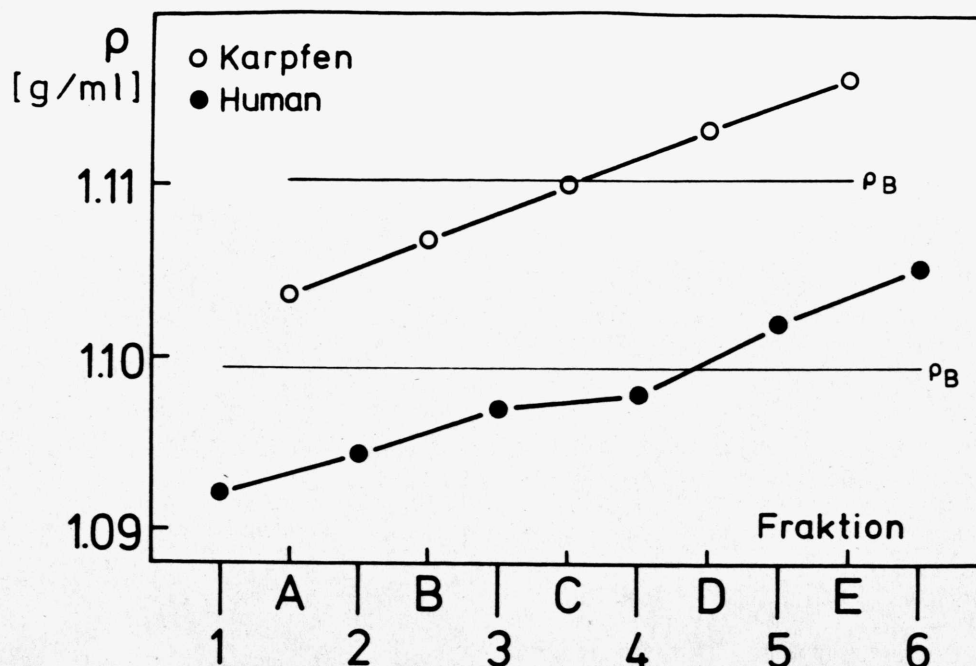
### 3.2. Dichte, MCV, MCH, MCHC in Erythrozytenfraktionen (Erg. zu 2.5.3.)

Die Bestimmung der Erythrozytendichte in den fraktionierten und unfraktionierten Karpfen- und Humanblutproben ergab kontinuierlich mit der Fraktionsnummer ansteigende Werte (Abb. 4; Tab. 4). Damit wurde die Wirksamkeit der Trennmethode belegt.

Die Werte für Hkt, Hb-konzentration und RBC in den Fraktionen sind auf Grund des Resuspendierens der nach Zentrifugation erhaltenen Zellsäulen nicht vergleichbar. Durch Bildung der Quotienten  $\text{Hkt} \cdot 10 / \text{RBC}$  (= MCV),  $\text{Hb-konzentration} / \text{RBC}$  (= MCH),  $\text{Hb-konzentration} \cdot 100 / \text{Hkt}$  (= MCHC) erhält man jedoch drei repräsentative Grundparameter zur hämatologischen Charakterisierung der Fraktionen. Hierbei zeigten Human- und Karpfenerythrozyten grundlegende Unterschiede (Abb. 5; Tab. 5a,b):

- Bei Karpfenerythrozyten stiegen alle drei Werte mit der Dichte an.
- Die bei Humanerythrozyten bekannten Veränderungen (MCV sinkt, MCHC steigt und MCH bleibt unverändert) dienten zugleich als Beleg für die Trennmethode.

Die statistische Auswertung mittels doppelter Varianzanalyse zeigen die Tabellen. Die p-Werte wurden mit einem PC numerisch approximiert, so daß auch die Werte  $p < 0.1\%$  größenordnungsmäßig brauchbar wiedergegeben werden konnten. Zusätzlich ergab die multiple Regressionsanalyse für die Karpfenwerte von Null verschiedene mittlere Regressionskoeffizienten und Unterschiede zwischen den Gruppenmitteln mit jeweils  $p < 0.0001$ . Die zugehörigen multiplen Korrelationskoeffizienten waren:  $R_{\text{MCV}}=0.73$ ,  $R_{\text{MCH}}=0.88$ ,  $R_{\text{MCHC}}=0.81$ .



$\rho \left[ \frac{g}{ml} \right]$	Karpfen (n=6), je 5 Fraktionen		Human (n = 5), je 6 Fraktionen	
Fr. 1	1.1036	F: 19.97	1.0921	F: 58.69
Fr. 2	1.1068	FG: 4; 20	1.0943	FG: 5; 20
Fr. 3	1.1099	p<0.01%	1.0970	p<0.01%
Fr. 4	1.1131	SEM: $\pm 0.0011$	1.0978	SEM: $\pm 0.0006$
Fr. 5	1.1160	LSD: 0.0027	1.1020	LSD: 0.0015
Fr. 6			1.1051	

Abb. 4 / Tab. 4 : Mittelwerte der Erythrozytendichte in 5 gleich großen Fraktionen von Karpfenblut (n=6) bzw. 6 gleich großen Fraktionen von Humanblut (n=5); Doppelte Varianzanalyse mit F-Test, standard error of fraction means (SEM) und least significant difference (LSD); Der jeweilige Mittelwert für nicht fraktionierte Erythrozyten aus Mischblut ist durch die Linien ( $\rho_B$ ) wiedergegeben.

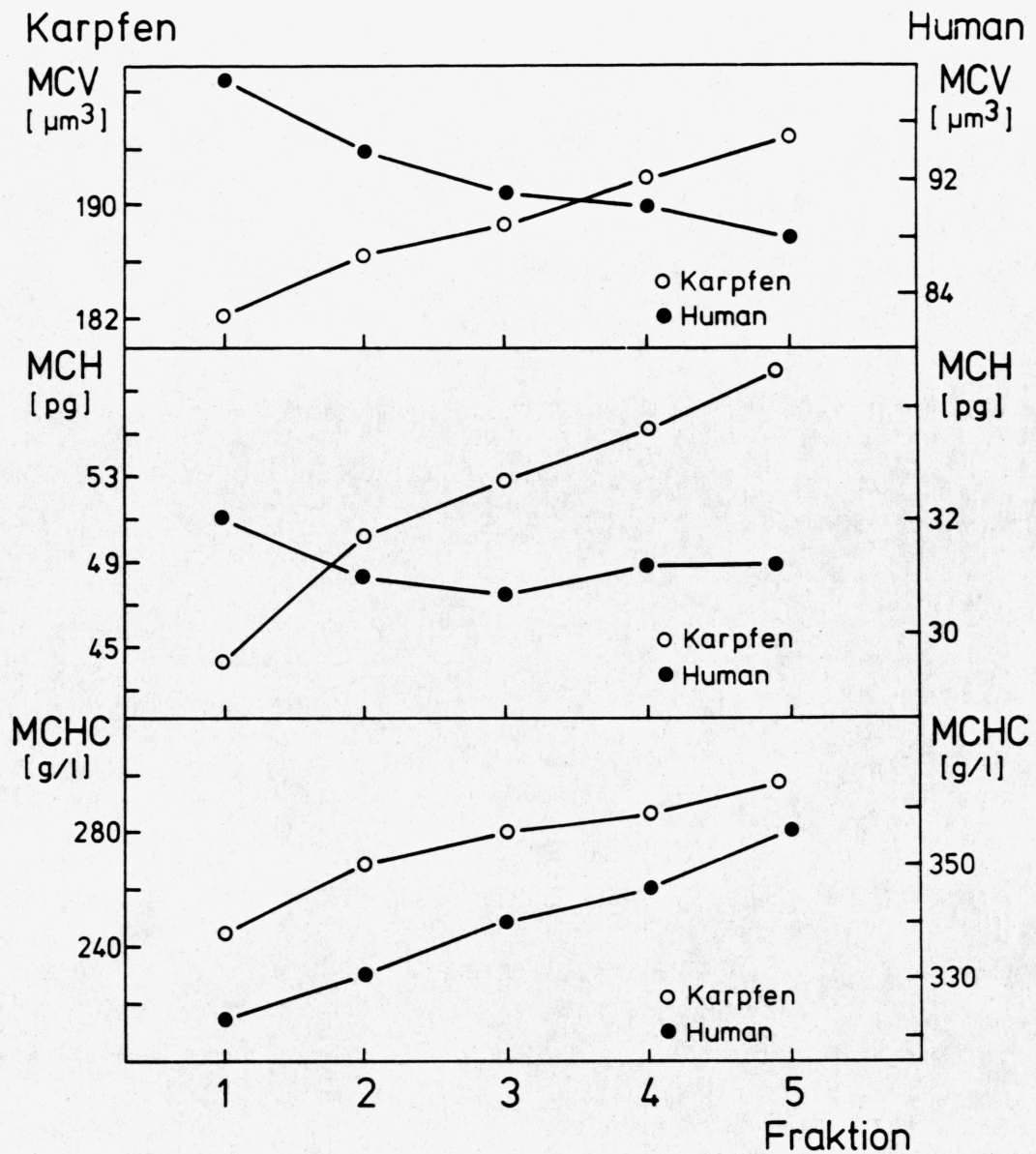


Abb. 5 : MCV, MCH, MCHC der Dichtefractionen (1-5; oben-unten) von Karpfenblut (n=10) und Humanblut (n=5); die zugehörigen Werte sind in Tab. 5a,b enthalten.



Karpfen (n=10)	MCV [ $\mu\text{m}^3$ ]	MCH [pg]	MCHC [g/l]
Fr. 1	182.1	44.6	244.7
Fr. 2	186.4	50.2	268.9
Fr. 3	188.6	52.9	280.0
Fr. 4	192.0	55.1	286.7
Fr. 5	194.9	58.0	297.6
F (FG):	10.3 (4;36)	35.5 (4;36)	20.8 (4;36)
	p<0.01%	p<0.01%	p<0.01%
SEM:	$\pm 1.55$	$\pm 0.86$	$\pm 4.42$
LSD:	3.70	2.04	10.55

Human (n=5)	MCV [ $\mu\text{m}^3$ ]	MCH [pg]	MCHC [g/l]
Fr. 1	98.9	32.0	322.5
Fr. 2	93.9	31.0	330.0
Fr. 3	91.0	30.7	339.6
Fr. 4	90.1	31.2	345.8
Fr. 5	87.9	31.2	355.2
F (FG):	20.7 (4;16)	0.9 (4;16)	19.5 (4;16)
	p<0.01%	n.s. (p>5%)	p<0.01%
SEM:	$\pm 0.93$	$\pm 0.48$	$\pm 2.91$
LSD:	2.29	--	7.17

Tab. 5 a,b : MCV, MCH, MCHC der Dichtefraktionen (1-5; oben-  
unten) von Karpfenblut (Tab. 5a) und Humanblut (Tab. 5b);  
Doppelte Varianzanalyse mit F-Test, standard error of  
fraction means (SEM) und least significant difference (LSD);

### 3.3. Hämoglobinabsorption von Einzelzellen per Mikroskop - Cytophotometrie (Erg. zu 2.5.4.)

Die geschilderte scanning stage absorbance cytophotometry mit angegliedertem Rechenprogramm (2.5.4.) lieferte die integrierte Hämoglobinabsorption einer Einzelzelle (A.U.). Die Messung von ca. 100 zufällig gewählten Zellen pro Fraktion und die anschließende Mittelwertbildung ergab in drei Experimenten jeweils kontinuierlich mit der Dichte ansteigende Werte bei Karpfenerythrozyten, während sich diese in Humanerythrozyten nicht signifikant veränderten (Abb. 6).

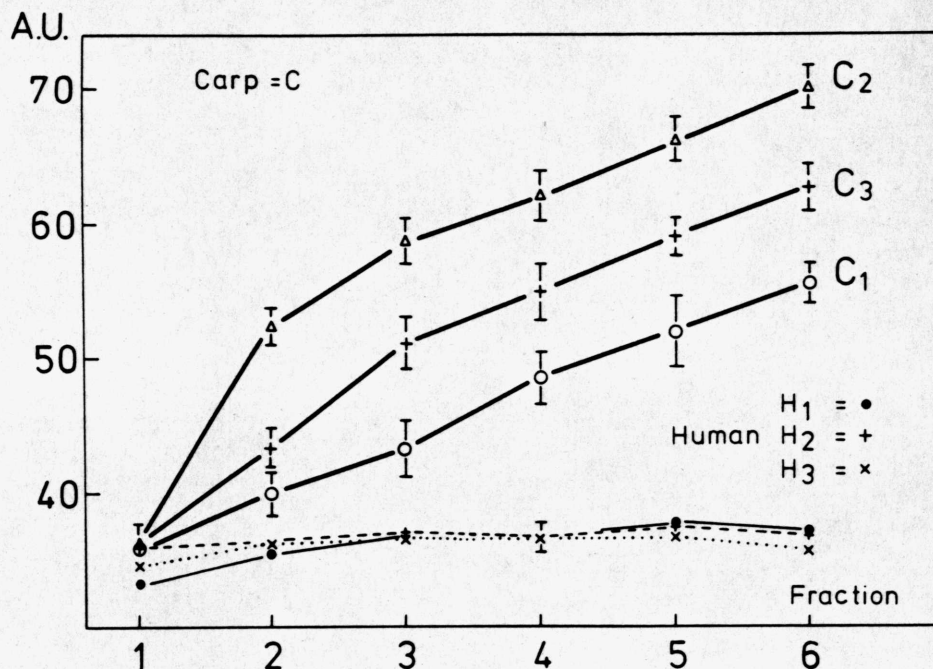


Abb. 6 : Integrierte Hämoglobinabsorption der Einzelerythrozyten (A.U.), ermittelt per Mikroskop-Cytophotometrie; dargestellt ist der Mittelwert aus je ca. 100 Einzelwerten pro Fraktion und Versuch; Balken = Standardabweichung;

Tab. 6 zeigt zusätzlich den Mittelwert für jede Karpfen- und Humanblutfraction aus den drei Experimenten und die dazugehörige statistische Auswertung. Die für die Karpfenversuche durchgeführte multiple Regressionsanalyse ergab einen von Null verschiedenen mittleren Regressionskoeffizienten und Unterschiede zwischen den Gruppenmitteln mit  $p < 0.0001$ ; der zugehörige multiple Korrelationskoeffizient war  $R = 0.95$ .

	A.U., Karpfen (n=3)		A.U., Human (n=3)	
Fr. 1	36.06	F: 34.9	34.61	F: 6.0
Fr. 2	45.19	FG: 5;10	36.04	FG: 5;10
Fr. 3	50.97	$p < 0.01\%$	36.92	$p < 1\%$
Fr. 4	55.15	SEM: $\pm 1.65$	36.64	SEM: $\pm 0.39$
Fr. 5	59.01	LSD: 4.23	37.38	LSD: 1.01
Fr. 6	62.76		36.60	

Tab. 6 : Integrierte Hämoglobinabsorption der Einzelerythrozyten (A.U.), ermittelt per Mikroskop-Cytophotometrie; dargestellt ist der Gesamtmittelwert der drei Versuche für jede Fraktion; statistische Auswertung: doppelte Varianzanalyse mit angeschlossenen Tests (s. Statistik 2.7.);

Die Histogramme der jeweiligen Karpfenblutfractionen verschieben sich mit ansteigender Dichte auf der Absorptionsskala nach rechts zu höheren Werten (niedrigste Absorption in Fr. 1: Klasse 12-18 [A.U.] ; höchste Absorption in Fr. 6: Klasse 84-90 [A.U.] !); die analogen Histogramme der Humanblutfractionen zeigen keine Tendenz zu ansteigenden Absorptionswerten. Ein repräsentatives Beispiel der drei Versuche zeigt Abb. 7. Da diese Absorptionswerte A.U. (siehe x-Achse) bei allen Zellen in gleicher Weise ermittelt wurden (s. 2.5.4.), dienen sie auch ohne nähere Definition der Einheit zum relativen Vergleich der Fraktionen.

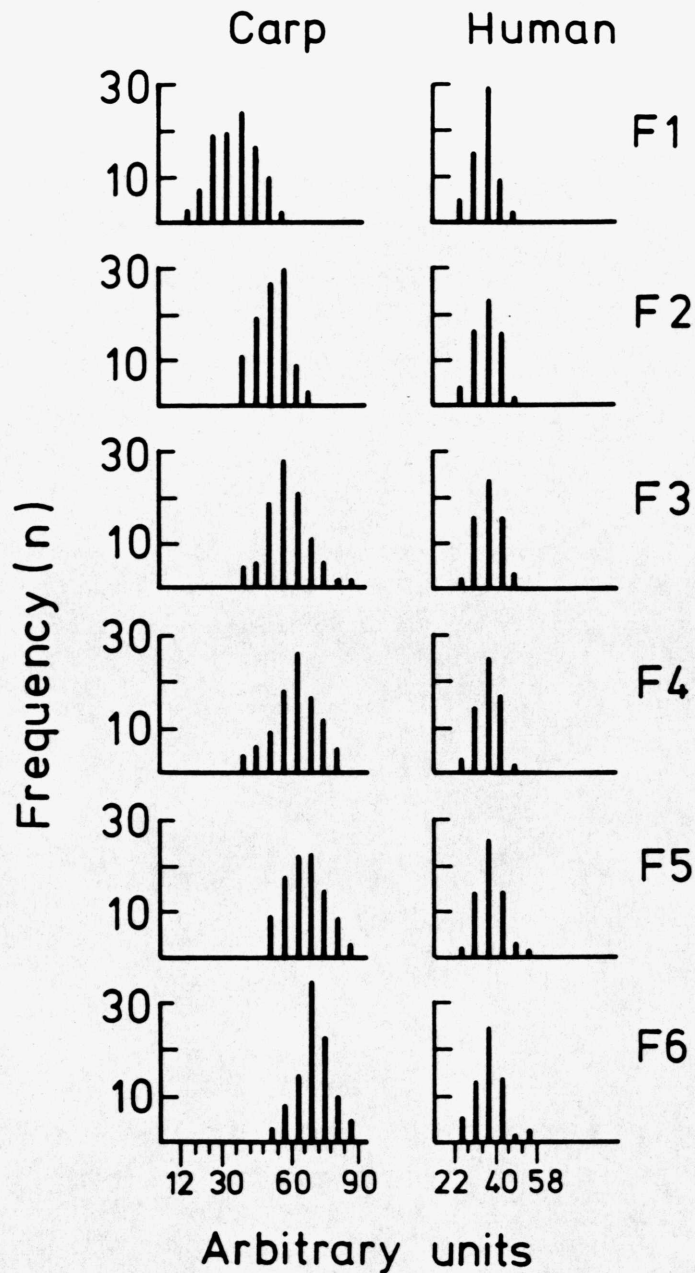


Abb. 7 : Histogramme der integrierten Hb-absorptionswerte (A.U.), gemessen an der Einzelzelle per Cytophotometrie; dargestellt ist je ein Versuch mit 6 Dichtefractionen (F1-F6; oben-unten) von Karpfen- und Humanblut; die Länge der Balken ist ein Maß für die Anzahl der Zellen mit einem Absorptionswert innerhalb der entsprechenden Klassenbreite.



### 3.4. Erythrozytenmarkierung in Abhängigkeit vom Zellalter beim Karpfen (Erg. zu 2.5.5.)

Die für den Glycineinbau- Versuch gewählten Bedingungen, unter denen die Fische gehalten wurden (s. 2.5.5.), veranlaßten die Karpfen zu unterschiedlichen Stoffwechselaktivitäten, was sich bereits in den Gewichten der Fische niederschlug (s. Tab. 7a,b). Die Karpfen der Gruppe B verloren unter Reservebedingungen an Gewicht und nahmen bei Änderung dieser Bedingungen nach 110 Tagen wieder zu, während die Fische der Gruppe A (Aktivbedingungen) ihr Gewicht über den Untersuchungszeitraum in etwa beibehielten oder leicht steigerten.

7 a	Tag 7	21-28	35	49-51	70-77	94-119	133-163	203-210
C 1	1870	1888	1947	1969	1971	1812	2053	2025
C 2	1950	1965	2045	2041	2223	2175	2350	2398
C 3	1524	1537		1560	1652	1740	1834	1852
C 4	1938	1977		2050	2272	2381	2482	2495
C 5	1725	1754		1752	2079	2088	2109	2123
7 b	Tag 2	21-22	41-43	71-80	111-116	158-160	202-206	
C 6	1872	1812	1721	1698	1548	1823	1945	
C 7	1725	1701	1642	1581	1537	1726	1854	
C 8	1762	1710	1629	1599	1542	1651	1782	
C 9	1895	1832	1748	1652	1593	1885	1993	
C10	1748	1622	1579	1530	1425			

Tab. 7a,b : Gewichte (in [g]) der Karpfen der Gruppe A (C1-C5) (Tab. 7a) bzw. der Gruppe B (C6-C10) (Tab. 7b) während des Langzeitversuchs mit Glycin (s. Abb. 8a,b) zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten (Tag 2-210).

Fr.	Karpfen (n=5)					Human
1	54.3	55.4	36.4	39.6	44.7	21.3
2	17.8	13.9	20.7	28.5	20.2	20.1
3	11.8	10.7	16.0	16.1	14.5	19.8
4	10.1	10.6	13.7	9.5	12.5	19.7
5	6.0	9.5	13.3	6.3	8.1	19.1

Tab. 8 :  $C^{14}$ - Radioaktivität (in %) in den Dichtefraktionen (1-5; oben-unten) von Karpfenblut (n=5) und Humanblut (n=1), am 2. Tag nach in vitro- Markierung und anschließender Reinjektion (Karpfen) bzw. Aufbewahrung bei 4°C (Human).

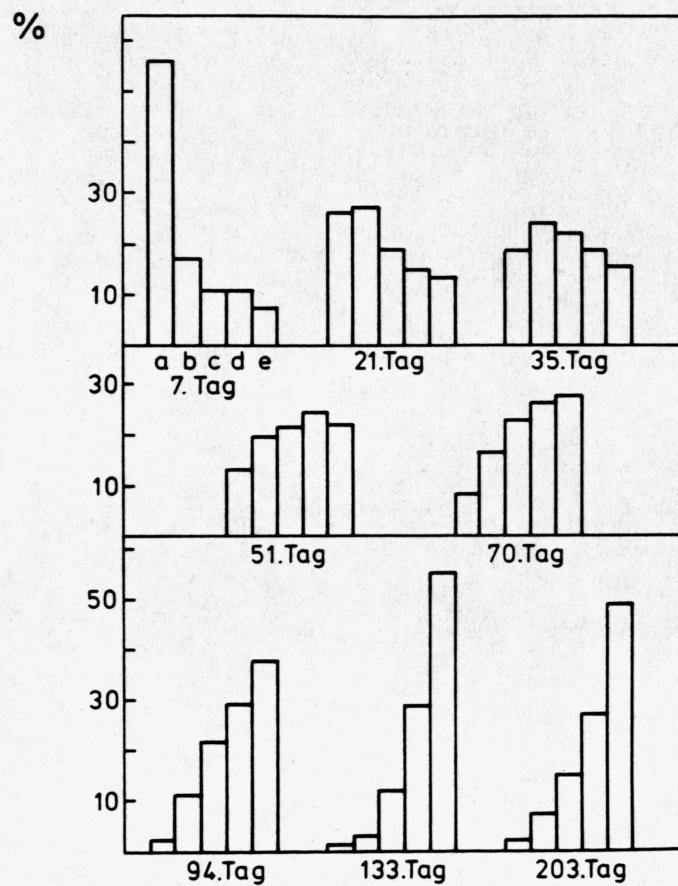
Abb. 8a (C1-C5) und 8b (C6-C10) zeigen die prozentuale Verteilung der Radioaktivität in den 5 Dichtefraktionen während des Untersuchungszeitraums, bestimmt als cpm/ $10^9$  cells und berechnet als prozentualer Anteil von der Gesamtaktivität (= 100 %) im Blut zum jeweiligen Abnahmezeitpunkt.

Nach in vitro- Markierung der 10 Karpfenblutproben und anschließender Reinjektion war bei allen Fischen 1 bzw. 6 Tage später die höchste Aktivität in den leichtesten Erythrozyten zu finden, mit kontinuierlicher Abnahme die geringste Aktivität in den schwersten Erythrozyten (s. auch Tab. 8), die hier immer noch um den Faktor 5-25 höher war als in Plasma.

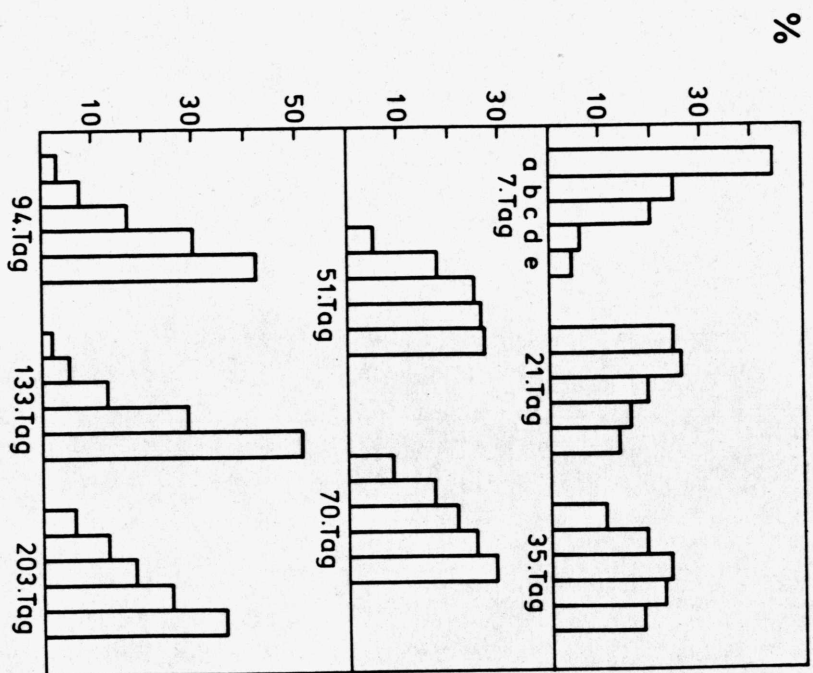
Diese Verteilung kehrte sich im Laufe des Untersuchungszeitraums um, bis schließlich die höchste Radioaktivität in den dichtesten Erythrozyten enthalten war, und sich im Histogramm ein Spiegelbild zum Anfangszustand einstellte.

Bei den Fischen der Gruppe A (Aktivbedingungen) dauerte dieser Prozeß ca. 3-4 Monate, bei den Fischen der Gruppe B (Reservebedingungen) ca. 4-5 Monate und kam hier erst richtig in Gang, als diese Fische ebenfalls unter Aktivbedingungen gehalten wurden.

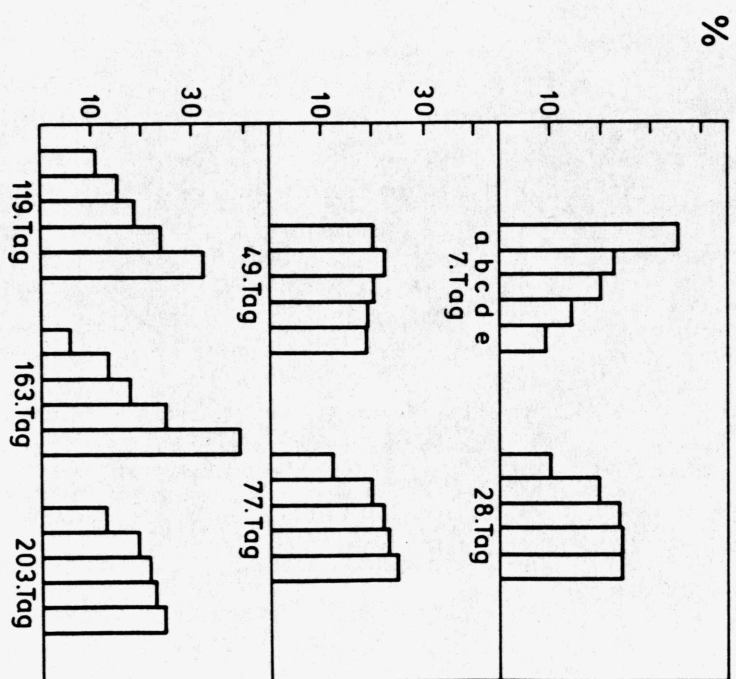
Danach stieg die Radioaktivität in den leichteren Zellen wieder an, bis mitunter sogar eine nahezu gleichmäßige Verteilung in den Fraktionen erreicht wurde.



C1



C2

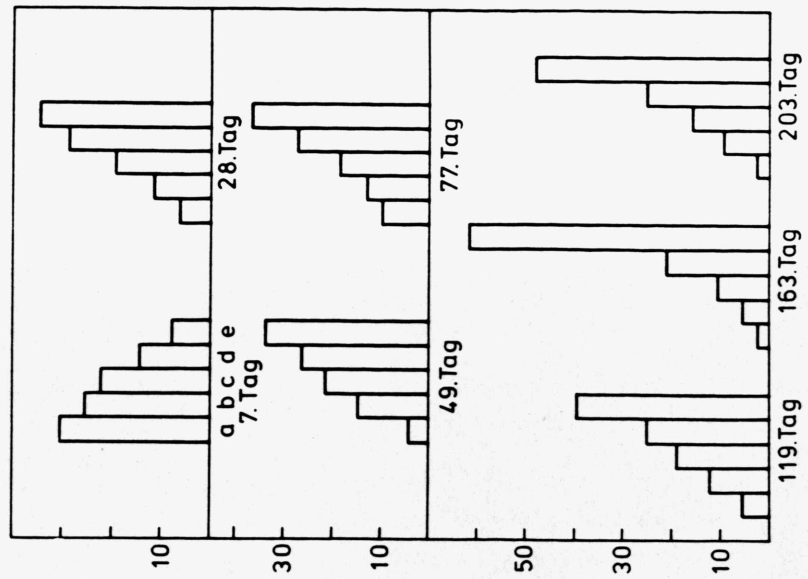


C3



C4

%



C5

%

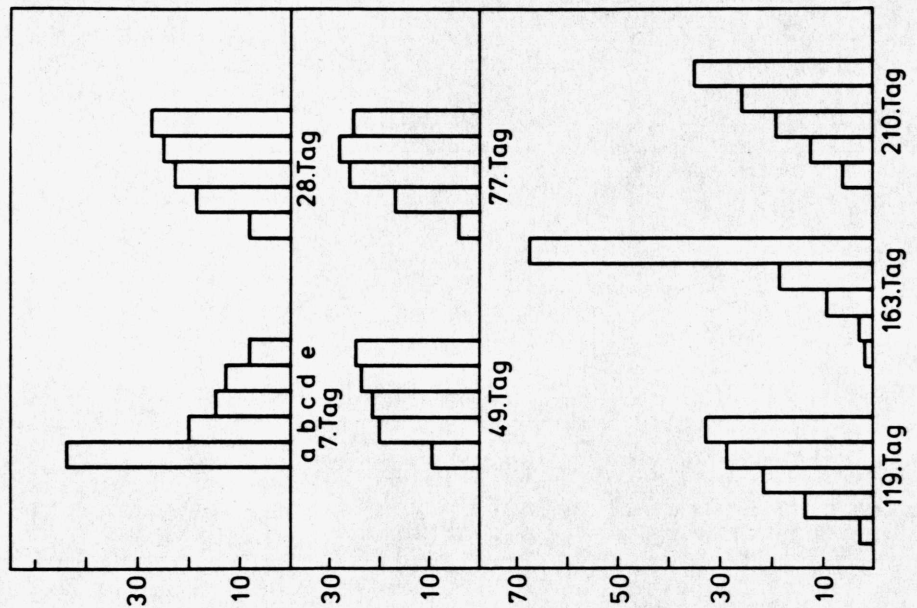
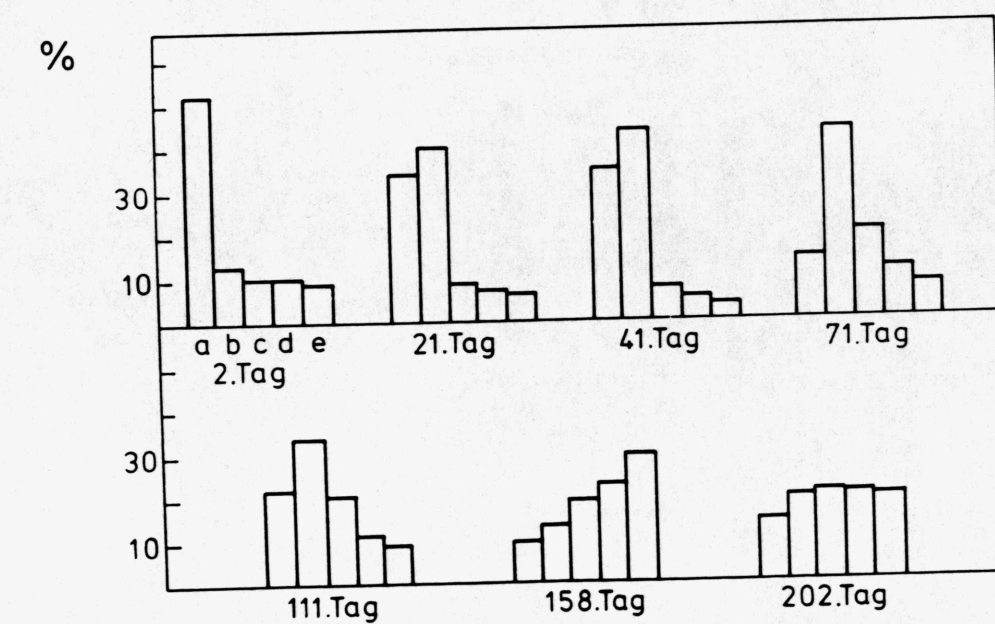
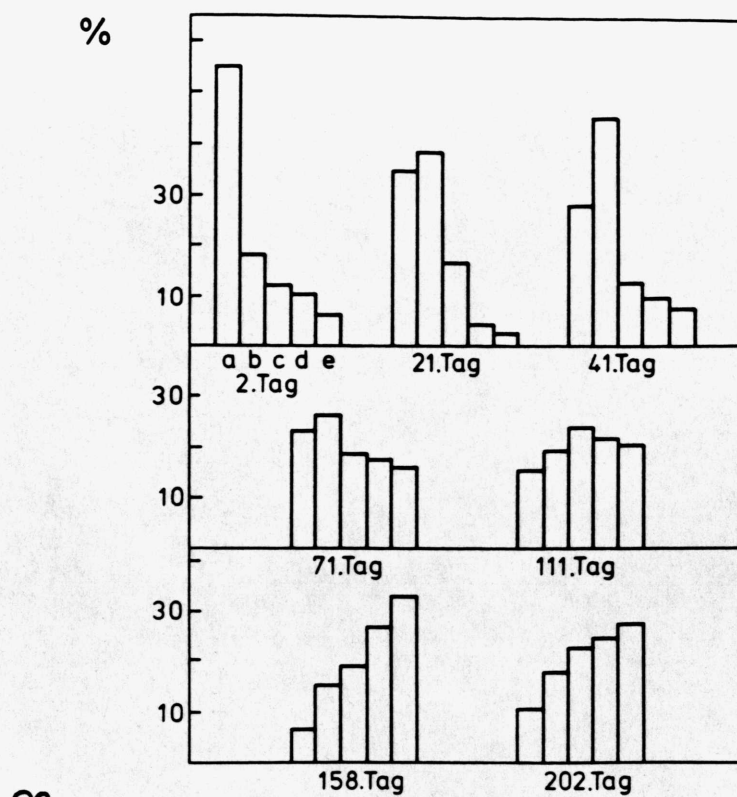
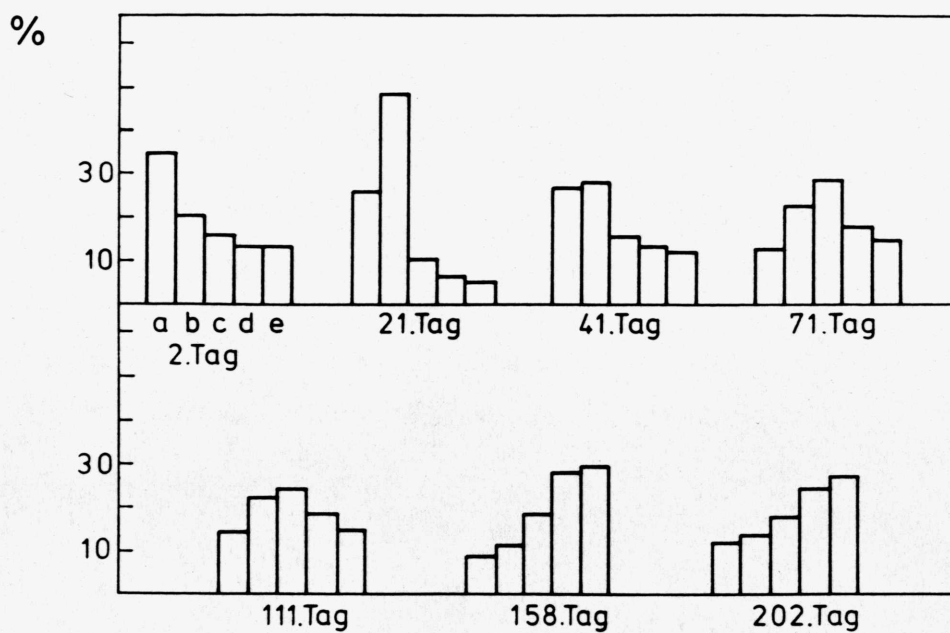
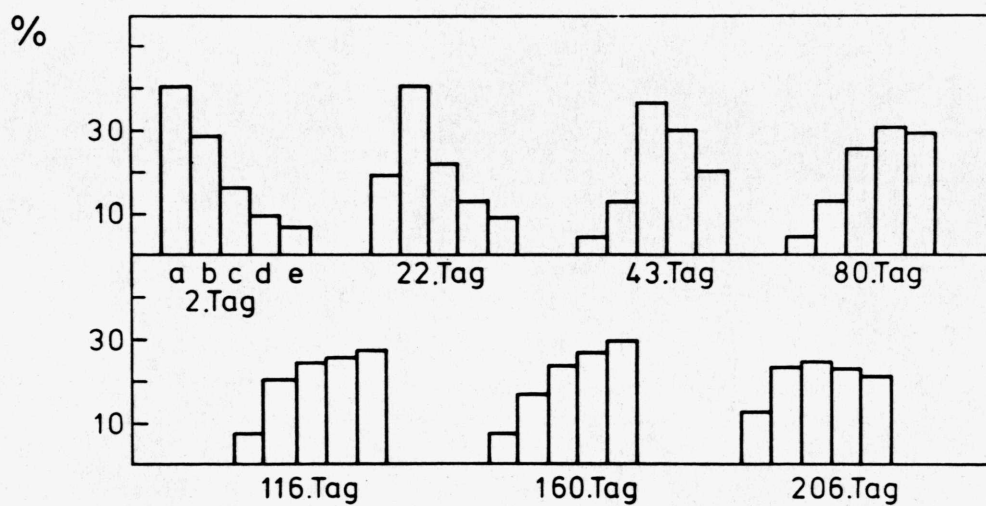


Abb. 8 a (C1-C5) : Säulenhistogramme zum Langzeitversuch mit  $2\text{-C}^{14}\text{-Glycin}$ ; dargestellt sind die prozentualen Anteile der  $\text{C}^{14}$ - Radioaktivität (in %) in den 5 Dichtefractionen (a-e; oben-unten) im Verlauf der Abnahmezeitpunkte (x. Tag); Fische der Gruppe A (C1 - C 5)





C8



C9

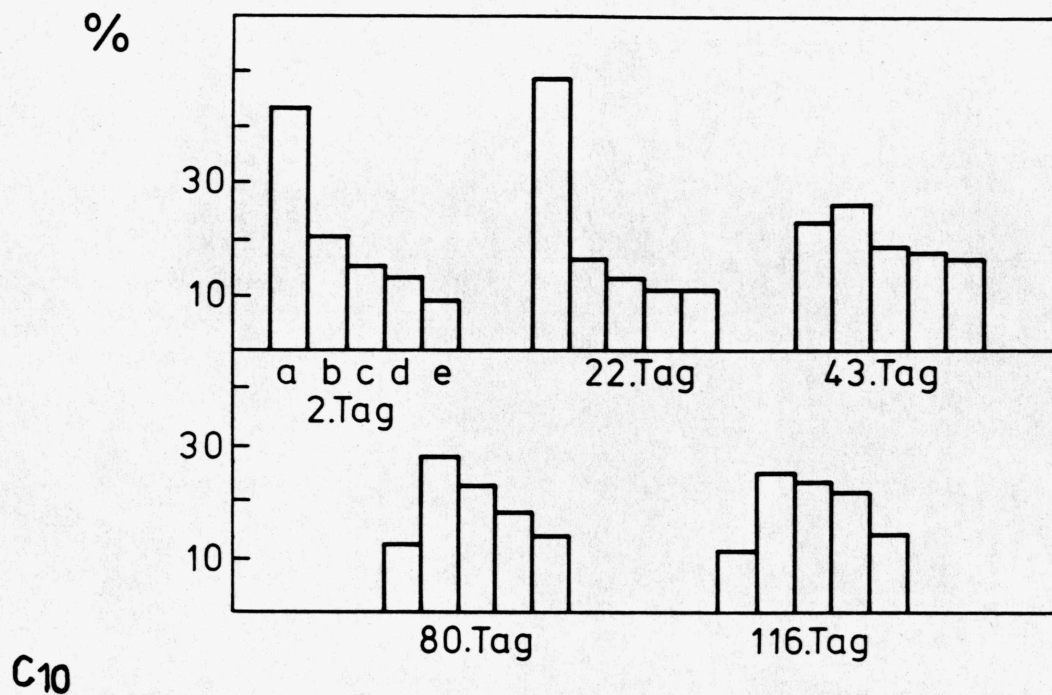


Abb. 8 b (C6-C10) : Säulenhistogramme zum Langzeitversuch mit 2-C<sup>14</sup>-Glycin; dargestellt sind die prozentualen Anteile der C<sup>14</sup>- Radioaktivität (in %) in den 5 Dichtefractionen (a-e; oben-unten) im Verlauf der Abnahmezeitpunkte (x. Tag); Fische der Gruppe B (C 6 - C 10)



### 3.5. Erythrozyten - Markierung bei Humanblut (Erg. zu 2.5.5.)

Im Gegensatz zu den Karpfenblutfractionen war in den 5 Humanblutfractionen am 2. Tag nach in vitro- Markierung mit 2-C<sup>14</sup>-Glycin die Radioaktivität in etwa gleich hohem Maß vorhanden, mit Tendenz zu einer leichten Erhöhung in der ersten Fraktion (Tab. 8; Tab. 9). Der Plasmawert (s. Tab. 9; cpm/μl Plasma) war in etwa so hoch wie diese intrazellulären Radioaktivitätswerte (s. Tab 9; cpm/μl RBC).

	cpm	cpm	cpm
	10 <sup>6</sup> Zellen	μl (RBC)	μl Plasma
F 1	141.0	1356	
F 2	133.2	1315	
F 3	131.3	1283	1050
F 4	130.8	1244	
F 5	126.3	1228	

Tab. 9 : Vergleich der C<sup>14</sup>- Radioaktivität der Humanblutfractionen (F 1-F 5; oben-unten) untereinander (linke Wertereihe) bzw. mit dem Plasmawert (rechter Teil der Tabelle, ermittelt am 2. Tag nach in vitro- Markierung).

### 3.6. Einbau von C<sup>14</sup> in Hämoglobin, Häm und Globin (Erg. zu 2.5.6.)

Nach Gelfiltration eines Karpfenbluthämolysats sofort nach in vitro- Inkubation waren im Eluat zwei C<sup>14</sup>-Peaks und ein Hb-Peak sichtbar, wobei ein C<sup>14</sup>-Peak mit dem Hb-Peak zusammenfiel (Abb. 9).

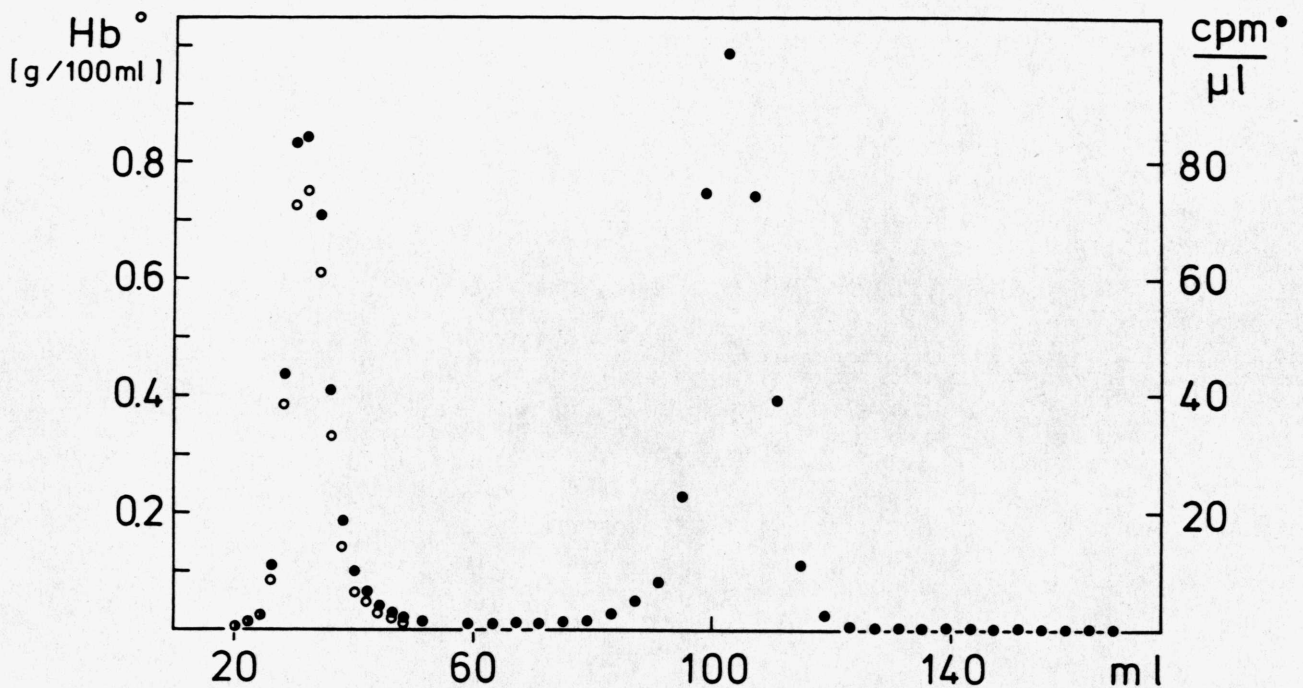


Abb. 9 : Verteilung von Hb (offene Kreise o) und C<sup>14</sup>-counts (geschlossene Kreise •) im Eluat der Gelfiltration von Karpfenbluthämolyt sofort nach in vitro- Markierung.

Eine analog durchgeführte Bestimmung mit markierter Humanblutprobe sofort nach Inkubation mit radioaktivem Glycin ergab dagegen zwei verschiedene, deutlich getrennte Peaks für Hb und C<sup>14</sup>, wobei die Radioaktivität in niedrigmolekularen Substanzen im Eluat der Gelfiltration wiedergefunden wurde, wahrscheinlich als 2-C<sup>14</sup>-Glycin (Abb. 10).

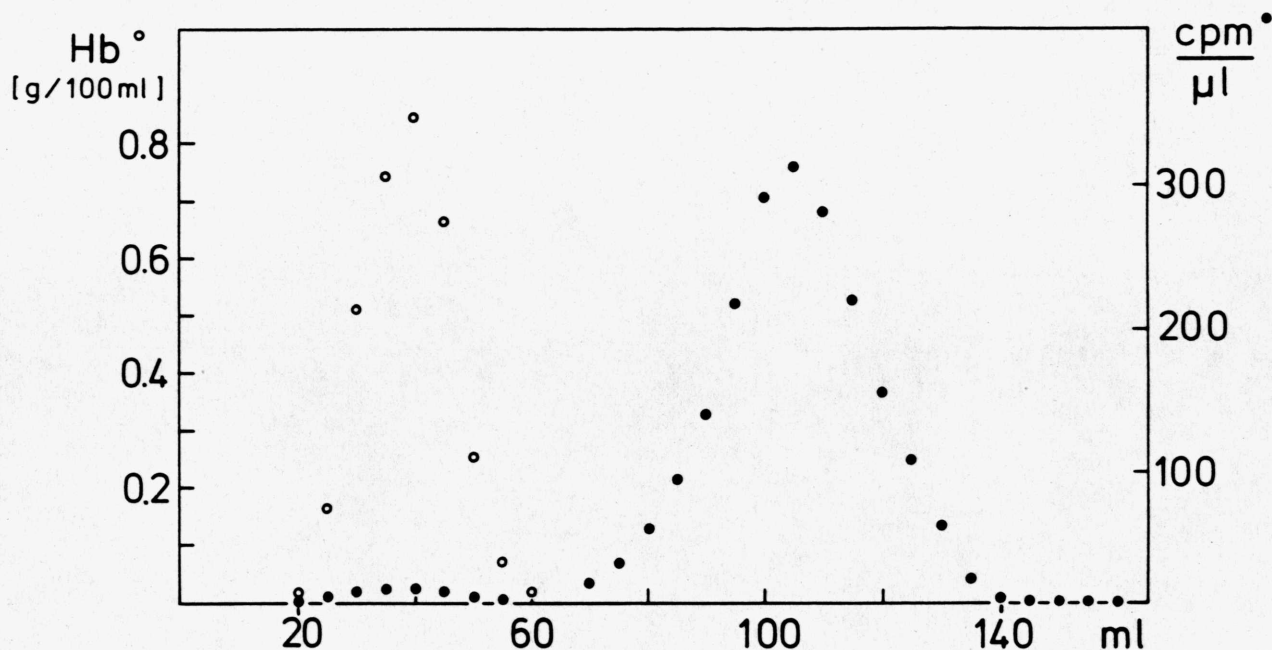


Abb. 10 : Verteilung von Hb (offene Kreise o) und C<sup>14</sup>-counts (geschlossene Kreise ●) im Eluat der Gelfiltration von Humanbluthämolysat sofort nach in vitro- Markierung.

Am 35. Tag nach der Markierung zeigte die Gelfiltration von Karpfenbluthämolysat je einen Peak für Hb und C<sup>14</sup>, die zusammenfielen. An der Stelle des zweiten C<sup>14</sup>-Peaks der Gelfiltration unmittelbar nach Markierung war nur noch eine leicht erhöhte Radioaktivität sichtbar (Abb. 11).

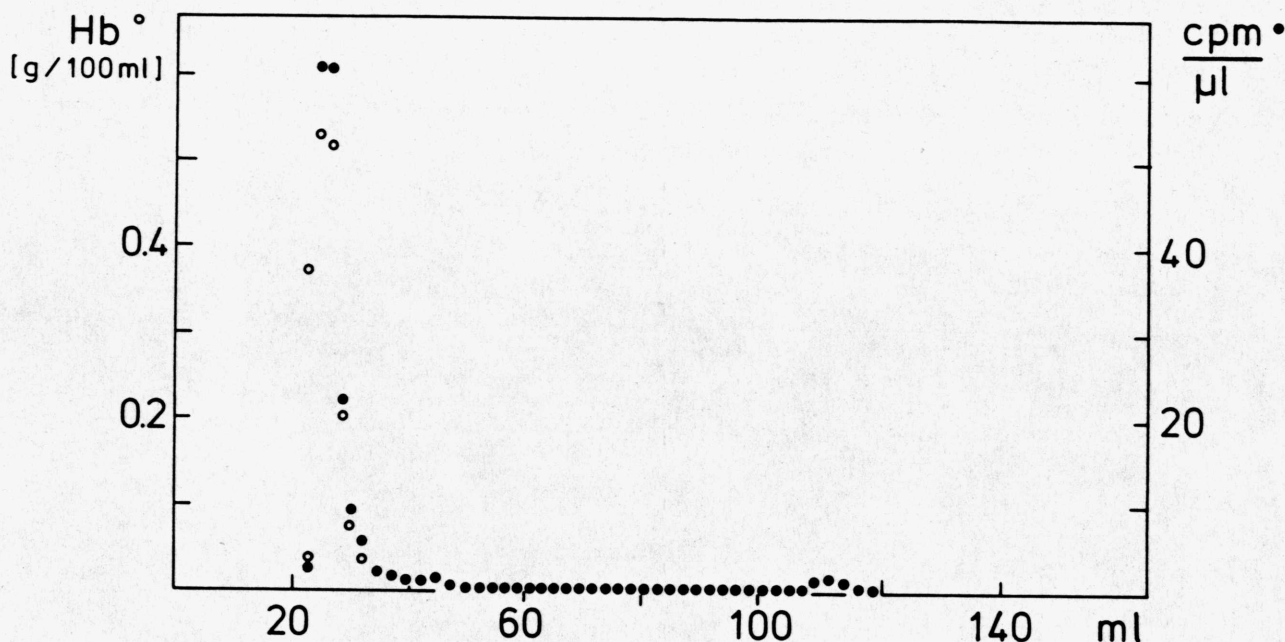


Abb. 11 : Verteilung von Hb (offene Kreise o) und C<sup>14</sup>-counts (geschlossene Kreise •) im Eluat der Gelfiltration von Karpfenbluthämolysat am 35. Tag nach in vitro- Markierung und anschließender Reinjektion.

Die isoelektrische Fokussierung des radioaktiven Karpfenbluthämolysats zeigte drei Hb-Hauptbanden an (Abb. 12 a), die alle radioaktiv mit C<sup>14</sup> markiert waren (Abb. 12 b, Autoradiographie des Elektropherogramms). Direkte Radiographie des Elektropherogramms mit Isomess Scanner bestätigte die Anwesenheit von C<sup>14</sup> in allen drei Banden.



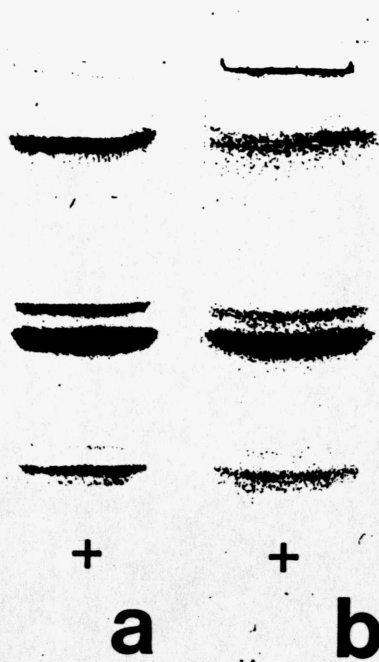


Abb. 12 : Isoelektrische Fokussierung (Dünnschicht-Polyacrylamidgele) von Karpfenhämoglobin (mit CO begast) unmittelbar nach Markierung mit 2- $C^{14}$ -Glycin (a); Detektion per Autoradiographie (b); die Aufspaltung der Banden könnte eine Artefaktbildung (Wechselwirkung mit der Matrix) sein; dieses Phänomen trat bei IEF von Fischhämoglobinen öfters auf (Wurm, unveröffentl. Ergebnisse);

Tab. 10 zeigt, daß nach Aufspaltung des Hämoglobins in Häm in und Globin die  $C^{14}$ -Radioaktivität in beiden Komponenten vorhanden war. Das Verhältnis war etwa 1:2. Das aufgenommene Häminspektrum (in Aceton/HCl) wurde durch Vergleich der Wellenlängen der Maxima und der Quotienten  $E/e$  an diesen Wellenlängen, die die relative Häminkonzentration wiedergeben, mit den Angaben von Lewis (1954) identifiziert (s. Tab. 11).

	Karpfen 1	Karpfen 2
Haemin	35.7 %	31.7 %
Globin	64.3 %	68.3 %

Tab. 10 : Prozentuale Verteilung der  $C^{14}$ - Radioaktivität in Hämin und Globin nach Spaltung des Karpfenhämoglobins mit Aceton/HCl in zwei Versuchen, 34 Tage nach in vitro-Markierung.

$\lambda_{\max}$ (Lewis) [nm]	512	540	640
$\lambda_{\max}$ (Meßwert) [nm]	512.5	540.6	640.8
E (Meßwert)	0.673	0.657	0.341
$\epsilon$ (Lewis) [l/cm·g]	13.7	13.6	7.1
c (=E/ $\epsilon$ ) [ $10^{-2}$ ·cm·g/l]	4.91	4.83	4.80

Tab. 11 : Vergleich des Absorptionsspektrums der Häminlösung (in Aceton/HCl) mit den Literaturangaben (Lewis 1954) an Hand der Absorptionsmaxima und den relativen Häminkonzentrationen, errechnet als Quotienten aus E (gemessen) und  $\epsilon$  (Literaturwert) an diesen Wellenlängen.

### 3.7. IEF von Karpfenblutfractionen (Erg. zu 2.5.6.)

Die Untersuchung von verschiedenen Dichtefractionen und Mischblut mit IEF ergab folgendes Bild (Abb. 13; repräsentativ für 5 einander entsprechende Ergebnisse):

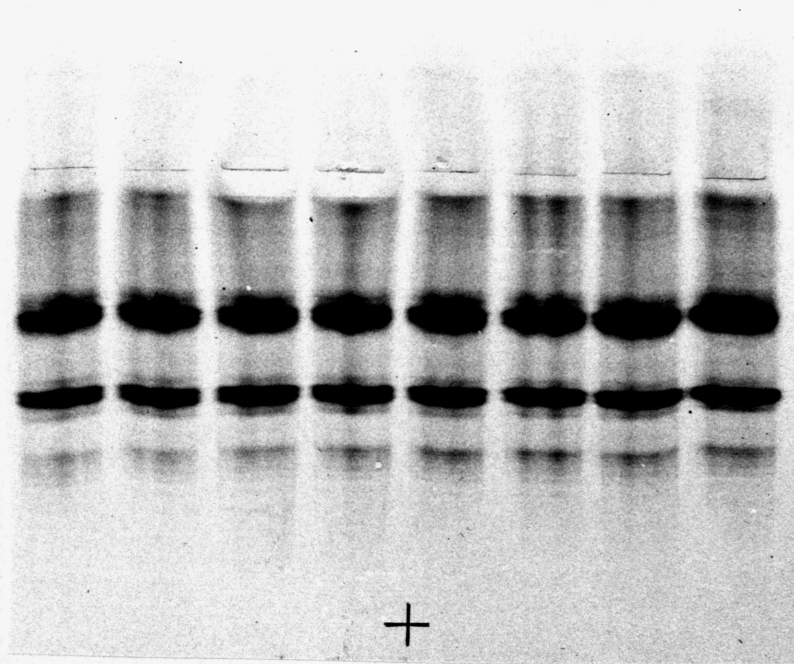


Abb. 13 : Isoelektrische Fokussierung von CO-Hämoglobin aus Dichtefraktionen und Mischblut vom Karpfen; von rechts nach links abgebildet sind je zweimal die Hb-banden der Erythrozyten der obersten, der mittleren und der untersten von 5 Dichtefraktionen, sowie aus Mischblut.

Auch hier waren keine Unterschiede in den Hb-banden verschieden alter Erythrozyten zu erkennen.

3.8. Ergebnisse der enzymatischen Bestimmungen (Erg. zu 2.6.2.)

Tab.	Karpfen (n=3)		Tab.	Human (n=3)	
12 a	[I.U./l]		12 b	[I.U./g Hb]	
Blut	113.0		Blut	28.9	
Fr. 1	81.0	F: 1.44	Fr.1	32.1	F: 9.9
Fr. 2	77.0	FG: 4;8	Fr.2	30.6	FG: 4;8
Fr. 3	74.7	p>5% (n.s.)	Fr.3	29.6	p<0.5%
Fr. 4	79.0	SEM: ±2.52	Fr.4	27.7	SEM: ±0.67
Fr. 5	73.7	LSD: --	Fr.5	26.9	LSD: 1.76
Plasma	68.7				

Tab. 12 a : Enzymaktivitäten der Acetylcholinesterase in Dichtefraktionen (Fr.1-Fr.5; oben-unten) von Erythrozyten (resuspendiert in Salzlösung PSC), Mischblut und Plasma vom Karpfen, angegeben in I.U./l Blut, Fraktion bzw. Plasma; Doppelte Varianzanalyse mit angeschlossenen Tests (s. Statistik 2.7.); die sehr niedrigen Werte befinden sich in einem kaum mehr meßbaren Bereich; der Plasmawert ist kaum niedriger als die intrazellulären Werte;

Tab. 12 b : Enzymaktivitäten der Acetylcholinesterase in Dichtefraktionen (Fr.1-Fr.5; oben-unten) von Humanerythrozyten (resuspendiert in isot. NaCl) und Mischblut, angegeben in der allgemein üblichen Einheit I.U./g Hb; Doppelte Varianzanalyse mit angeschlossenen Tests (s. Statistik 2.7.); (zum Vergleich mit Tab. 12 a): 30 I.U./g Hb entsprechen ca. 5000 I.U./l Blut bzw. ca. 10000 I.U./l RBC!



Tab. 13	GOT	G6PDH	POX	GRED
Karpfen:	n=8	n=10	n=5	n=10
Einheit:	[I.U./10 <sup>12</sup> c]	[I.U./10 <sup>12</sup> c]	[I.U./10 <sup>9</sup> c]	[I.U./10 <sup>12</sup> c]
Misch	417.5	618.9	9924.6	201.0
Fr. 1	402.0	635.3	9286.2	219.3
Fr. 2	405.1	573.6	9452.0	202.3
Fr. 3	419.5	588.3	9468.6	187.7
Fr. 4	412.5	610.9	9947.8	183.0
Fr. 5	425.3	624.4	10096.4	76.2
F:	1.15	1.76	0.67	14.3
FG:	4; 28	4; 36	4; 16	4; 36
P:	p>5% (n.s.)	p>5% (n.s.)	p>5% (n.s.)	p<0.05%
SEM:	±9.0	±19.2	±427.7	±14.9
LSD:	--	--	--	35.5

Tab. 13 : Enzymaktivitäten (Aspartat-Aminotransferase/GOT; Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase/G6PDH; Peroxidase/POX; Glutathion-Reduktase/GRED) in Dichtefraktionen (1-5; oben-unten) von Erythrozyten (resuspendiert in PSC) und in resuspendierten Erythrozyten ohne Fraktionierung (Misch) vom Karpfen; Einheit: I.U./10<sup>9</sup>Zellen (I.U./10<sup>9</sup>c) bzw. I.U./10<sup>12</sup>Zellen (I.U./10<sup>12</sup>c); doppelte Varianzanalyse mit angeschlossenen Tests (s. Statistik 2.7.); der GRED-Abfall in Fr. 5 ist mit p<0.05% (LSD-Test) signifikant;

Die wesentlichen Ergebnisse der Enzymbestimmungen im Karpfenerythrozyten sind:

- 1.) Acetylcholinesterase ist im Karpfenerythrozyten in einem kaum meßbaren Bereich vorhanden (s. Tab. 12 a);
- 2.) Glutathion-Reduktase nimmt im Karpfenerythrozyten - vor

allem in der letzten Fraktion - in ihrer Aktivität stark ab (Tab. 13);

3.) bei den anderen Enzymaktivitäten sind im Karpfen-erythrozyten keine signifikanten Veränderungen innerhalb der Zellfraktionen erkennbar (Tab. 13).

Tab. 14	GOT	G6PDH	GRED			
	XM	XM	XM	H1	H2	H3
Human :	n=3	n=3	n=3			
Einheit:	[I.U./g Hb]	[I.U./g Hb]	[I.U./g Hb]	[I.U./g Hb]		
Misch	2.53	6.74	3.44	3.53	3.35	3.44
Fr. 1	3.17	9.79	3.87	3.73	3.66	4.23
Fr. 2	2.78	7.81	3.68	3.96	3.61	3.48
Fr. 3	2.62	7.00	3.61	3.92	3.27	3.64
Fr. 4	2.42	6.72	3.31	3.36	3.21	3.36
Fr. 5	2.35	6.57	3.32	3.21	3.21	3.54
F:	18.0	57.6	3.5			
FG:	4; 8	4; 8	4; 8			
P:	p<0.1%	p<0.01%	p>5%(n.s.)			
SEM:	±0.08	±0.18	±0.13			
LSD:	0.20	0.46	--			

Tab. 14 : Enzymaktivitäten (Aspartat-Aminotransferase/GOT; Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase/G6PDH; Glutathion-Reduktase/GRED) in Dichtefractionen (1-5; oben-unten) von Humanerythrozyten (resuspendiert in PSC) und in resuspendierten Erythrozyten ohne Fraktionierung (Misch); doppelte Varianzanalyse mit angeschlossenen Tests (s. Statistik 2.7.); bei GRED sind auch die Einzelmeßreihen (H1-H3) aufgeführt.

## 4. DISKUSSION

### 4.1. Dichtentrennung

Ausgehend von der einfachen Schwerkraft fanden Prentice & Bishop (1965), daß mit Erhöhung der Faktoren Schwerkraft (g-Zahl bis 39000) und Zeit (bis 60 Min.) eine effektivere Zelltrennung per Zentrifugation erreicht wird. Rigas & Koler (1961), Garby & Hjelm (1963) und Piomelli et al. (1967) berichteten über gute Dichtentrennungen von Säugererythrozyten per Ultrazentrifugation in Ausschwing-Rotoren (swinging buckets). Demgegenüber stellt die Verwendung von feststehenden Rotoren (angle-head) und höheren Temperaturen (30°C) durch Murphy (1973) eine entscheidende Verbesserung dar, weil in den schräg stehenden Röhrchen während der Zentrifugation eine beständige innere Zirkulation der Zellen zu einer effektiveren Trennung führt. Auf Grund unterschiedlich starker Schwerkraftwirkung an der Außen- und Innenwand des Röhrchens wandern die schweren Zellen an der Außenwand nach unten, die leichteren an der Innenwand nach oben. Murphy's Verfahren der Zentrifugation in Festwinkel-Rotoren (34°) bei hoher Winkelgeschwindigkeit (15000 rpm), hohem Hämatokrit (85-90%), langer Trennzeit (1 h) und erhöhter Temperatur (zur Erniedrigung der Viskosität) wurde zur oft verwendeten und zitierten Methode (Cohen et al. 1976, Seaman et al. 1977, Trautsch et al. 1981, Fischbeck et al. 1982, Wolowyk 1982, Bartosz et al. 1978, Grzelinska et al. 1983).

Neben der Temperatur (für Karpfenerythrozyten wurde hier 15°C, für Humanerythrozyten 25°C gewählt) spielt für eine gute Auftrennung das verwendete Medium eine große Rolle. Prentice & Bishop (1965) berichteten über gute Ergebnisse bei Verwendung von Plasma, 0.9% NaCl, Glucoselösung (bis zu 10%) und Krebs-Ringer-Phosphatpuffer für Kaninchenerythrozyten,

während 20 % Glucoselösung zum Schrumpfen, Dextran- und PVP-Lösungen zum Verklumpen und 25% Humanalbumin-Lösung zu Hämolyse der Erythrozyten führte. Ebenso wurden verschiedene Dichtegradienten verwendet: Rinderserumalbumin (Prentice & Bishop 1965, Piomelli et al. 1967, Abraham et al. 1978), Phthalatetermischungen (Danon & Marikovsky 1964, Abraham et al. 1978), Percoll (Ellory & Wolowyk 1979, Imanishi et al. 1986, Lindena et al. 1986), Ficoll, Triosil-Ficoll (Boyd et al. 1967, Turner et al. 1974, Galbraith & Watts 1980, Magnani et al. 1983), Stractan (Arabinogalactan) (Pfeffer & Swislocki 1976, Goebel et al. 1977, Seaman et al. 1980, Glass & Gershon 1981, Mohandas et al. 1986).

Da in diesen Arbeiten stets nur kernlose Säugererythrozyten zentrifugiert wurden, wurden in eigenen Vorversuchen verschiedene Medien auf ihre Verwendbarkeit für Karpfenerythrozyten getestet (s. 2.5.2.) und schließlich eine physiologische Salzlösung für Karpfenerythrozyten (PSC) und 0.15 M NaCl für Humanerythrozyten zur Trennung beibehalten.

Um - gerade bei niederen Vertebraten mögliche - unphysiologische Fremdeinflüsse auf die Blutzellen (Hämolyseanfälligkeit, Transportvorgänge, Endozytosefähigkeit, Formveränderung, Zellaggregation, Beeinflussung von Hb-Struktur und Enzymaktivität !) von vornherein auszuschließen, wurden in den Versuchen bewußt keine organischen Materialien verwendet. Außerdem ist eine solche Gradiententechnik mit anschließender Aufarbeitung naturgemäß durch Anfälligkeit des biologischen Materials, Probenverlust und Zeitbedarf eingeschränkt und eignet sich schlecht für die hier auch im kleinen Ansatz mit geringen Blutmengen routinemäßig durchzuführenden Trennungen. Stattdessen wurde nach der Zentrifugation in separaten Kontrollversuchen mit Phthalat-estergradienten die Dichtentrennung und deren Effektivität bestätigt. Weil, wie schon Prentice & Bishop (1965) aufzeigten, bei wiederholter Trennung der jeweiligen Fraktion stets wieder eine Aufgliederung der Erythrozyten in Zellen



verschiedener Dichte erfolgt, nie also eine völlig diskrete Fraktionierung erhalten werden kann, kann davon ausgegangen werden, daß der hier vorgestellte Einsatz von besonders schmalen, langen Röhrchen eine Verbesserung gegenüber den großvolumigeren Gefäßen darstellt und einen effektiveren Dichtegradienten ermöglicht.

Nachdem also eine geeignete Trennmethode sowohl für Human- wie für Karpfenerythrozyten gefunden war (s. Fragestellung Nr. 1, Einleitung), wurden die erhaltenen Fraktionen hämatologisch und biochemisch untersucht.

#### 4.2. Zellalter und Hämoglobingehalt

##### 4.2.1. Blutzellbildung beim Fisch

Während bei Säugern im erwachsenen Zustand die Blutzellbildung im Knochenmark und in den lymphatischen Organen (Thymus, Milz, Lymphknoten) stattfindet, differieren hierzu die Angaben bei Knochenfischen (Teleostei): Niere, Milz, Thymus, zirkulierendes Blut (Jordan 1933, Catton 1951, Topf 1953, Kanesada 1956, Weinreb 1963, Fey 1965a, Haider 1968, Kreutzmann 1976, Ellis 1977, Iuchi & Yamamoto 1983). Jedenfalls wird in der Mehrzahl der Untersuchungen das intertubuläre Gewebe der Niere als hauptsächliche Bildungsstätte für die Blutzellen der roten und weißen Reihe genannt (Jordan & Speidel 1924, Catton 1951, Topf 1953, Hevesy et al. 1964, Fey 1965a, Haider 1968, Varo 1970). Die Milz hat bei Teleostiern eher die Funktion der Erythrozytenzerstörung, der -speicherung für Notsituationen (Fey 1965a, Johansson-Sjöbeck 1979, Yamamoto et al. 1980), sowie der Lymphozytopoiese und nur in untergeordnetem Maße die Aufgabe der Erythrozyten-

produktion (Johansson-Sjöbeck 1979, Fänge & Nilsson 1985), v.a. bei durch Hunger geschwächten Karpfen (Topf 1953). Der lymphoide Hämoblast (Hämozytoblast) im retikulären Nierengewebe als gemeinsame Ursprungszelle aller Blutzellen, und die Blutzellentwicklungslinie im Sinne einer der drei nachfolgend genannten Theorien einschl. ihrer Nomenklatur werden auch bei niederen Vertebraten diskutiert (Yoffey 1929, Duthie 1939, Catton 1951, Topf 1953, Kanesada 1956, Haider 1968, Boomker 1980, Mahajan & Dheer 1980). Nach der reinen monophyletischen Lehre von Maximow (1924) würden alle Blutzellen von einer gemeinsamen Ursprungszelle abstammen, nach Jordan & Speidel (1924) sind mit den gemeinsamen Vorläuferstammzellen die Lymphozyten identisch, die polyphyletische Lehre (Doan et al. 1925) postuliert zwei unabhängige Linien für die rote und die weiße Reihe.

Auffällige Übereinstimmungen in der Entstehung hämoglobinhaltiger erythroider Zellen mit "mitochondrion-like organelles" aus "Siderosomen" (Ferritinspeicher) und "lamellated bodies" (aus Doppelmembranen von zerstörten Mitochondrien) fanden Brunner et al. (1983) und Claussen (1985) mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen in blutbildenden Organen von Äsche, Frosch, Lanzenschlange, Huhn, Maus, Kaninchen, Meerschweinchen und Mensch.

Daß bei Knochenfischen die endgültige Reifung der Blutzellen auch im Kreislauf erfolgen kann, wird von verschiedenen Autoren berichtet (Kanesada 1956, Weinreb 1963, Yamamoto & Iuchi 1976, Härdig 1977, Schindler et al. 1986). Die Sperre, die dafür sorgt, daß unreife Erythrozyten in der Regel nicht in den Kreislauf entsandt werden, ist sozusagen offen (Fey 1965b, Haider 1967) und die funktionelle Auftrennung Replikation - Differenzierung - Reifung nicht so fein reguliert. Auf die Stoffwechselaktivität der peripheren Erythrozyten beim Fisch im Gegensatz zu Säugererythrozyten weisen Kernporen und Hämoglobinwanderung durch diese (Yasuzumi &

Higashizawa 1955, Weinreb 1963, Fawcett & Witebski 1964, Fey 1965b, Haider 1967, Kreutzmann & Jonas 1978, Zapata & Carrato 1981), das Vorhandensein von Substantia granulofilamentosa, Endoplasmatischem Reticulum, Golgi-Apparat, Mitochondrien, Polyribosomen (Fey 1965b, Haider 1967, Sekhon & Beams 1969, Kreutzmann & Jonas 1978, Lane & Tharp 1980, Weinreb 1983) und amitotische Zellteilungen in der Peripherie (Haider 1967, Deutsch & Engelbert 1970, Kreutzmann 1976) hin.

Verschiedene Quellen lassen es möglich erscheinen, daß der Karpfen im Rahmen seiner Anpassung an veränderte Umweltbedingungen (Jahreszeit, Lebensraum, Temperatur, Nahrungsangebot, Sauerstoffpartialdruck) und künstliche Versuchsbedingungen (Temperatur, Futterentzug, Hypoxie, Blutentnahme) auch die Erythropoiese und die Hämoglobinsynthese reguliert:

Schindler & de Vries (1986) fanden beim Karpfen zwei Wochen nach Blutabnahme (ca. 50%) das Auftreten einer peripheren Blutzellpopulation aus jungen Erythrozyten, sowie nach Hypoxie Hämoglobinsynthese in reifen Erythrozyten.

Zanjani et al. (1969) stellten in ihren Versuchen am blauen Fadenfisch (*Trichogaster trichopterus*) Hypoxie und einen erythropoietinähnlichen Regulator als Stimuli, sowie die transfusionsinduzierte Erhöhung der roten Blutzellen und Futterentzug als Inhibitor der Erythropoiese fest. Die nahezu vollständige Unterdrückung der Erythropoiese nach Futterentzug (beim Karpfen: Murachi 1959) konnte durch Fütterung und Zufuhr von Plasma anämischer Fische oder Enten bzw. Erythropoietin aus Humanurin oder Schafplasma wieder aufgehoben werden.

Krzyszowska et al. (1960) bestätigten den erythropoietischen Effekt von Plasma anämischer Schafe beim Karpfen.

Weinberg et al. (1972) beschrieben den suppressiven Effekt von Futterentzug auf die Erythropoiese beim roten



Paradiesfisch (*Macropodus opercularis*).

Lane & Tharp (1980) beobachteten bei Forellen nach 30-tägigem Futterentzug eine Abnahme junger Erythrozyten.

Abgesunkene Werte von Hämatokrit, Zellzahl, Hämoglobinkonzentration beim Goldfisch (*Carassius auratus*) infolge von durch Phenylhydrazininjektion herbeigeführter Anämie normalisierten sich bei 30°C, nicht aber bei 7°C (Chudzik & Houston 1983).

Erythropoietin hat primär die Funktion, die Menge roter Blutzellen und Hämoglobin so hoch zu halten, wie es für die Sauerstoffversorgung der Gewebe nötig ist. In der Erythropoietinforschung ist allgemein bekannt, daß Nahrungszustand und Hormone (Schilddrüsenhormone, Corticoide, Androgene, Catecholamine, Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, Prostaglandine) an der Vermittlung der Erythropoiesestimulation beteiligt sind, doch sind der genaue Mechanismus der Registrierung des Sauerstoffpartialdrucks im Gewebe einschließlich der Erythropoietinantwort, sowie der genaue Bildungsort für Erythropoietin in der Niere nicht geklärt (Gurney & Fried 1965, Harris & Kellermeyer 1972, Fink & Fisher 1977, Ingram 1985, Jelkmann 1986). Ein erythropoietinähnlicher, sauerstoffabhängiger hormoneller Reaktionsmechanismus wird aber auch bei niederen Wirbeltieren angenommen (Vögel: Rosse & Waldmann 1966, Zanjani et al. 1973, Samarut 1978; Reptilien u. Amphibien: Rosse et al. 1963, Zanjani et al. 1973; Fische: Krzymowska et al. 1960, Zanjani et al. 1969). Außerdem scheint bei Tierarten, die neben der Luftatmung Sauerstoff auf andere Weise aufnehmen, die Erniedrigung des Sauerstoffpartialdrucks im Gewebe erst dann zum Hauptstimulus der Erythropoiese zu werden, wenn damit eine Verminderung der zellulären Sauerstoff-Transporter (der Erythrozyten) verbunden ist (Zanjani et al. 1973).



#### 4.2.2. Weiterbestehen der Hämoglobinsynthese im peripheren Karpfenerythrozyten in vivo

In der oben zitierten Literatur finden sich aber keine Angaben darüber, ob es bei Knochenfischen ausschließlich unter besonderen Stoffwechselbedingungen zu weiterer Hämoglobinsynthese in den peripheren Erythrozyten kommt, und ob diese Fähigkeit im Laufe des Alterns der Zelle zum Erliegen kommt. Diese Fragestellung konnte mit den hier vorgestellten Untersuchungen näher beleuchtet werden.

Die mit Standardmethoden der klinischen Chemie bestimmten Parameter MCV, MCH und MCHC (s. 3.2.), sowie die cytophotometrisch ermittelte Hämoglobinabsorption (A.U.) (s. 3.3.) deuten darauf hin, daß im Laufe des Alterns der Karpfenerythrozyt an Volumen (s. auch Beobachtungen an anderen Knochenfischen: Catton 1951, Weinberg et al. 1973, Lane et al. 1982) und Hb-gehalt zunimmt, während der Säugererythrozyt bei unverändertem Hb-gehalt kleiner wird (s. auch Piomelli et al. 1967, Cohen et al. 1976). Damit ist hier die Fragestellung 2 der Einleitung noch einmal beantwortet.

Diese Ergebnisse sind auf Grund der morphologischen Gegebenheiten, nämlich der Ausstattung und Entwicklung der Erythrozyten bei Säugern und niederen Wirbeltieren erklärbar. In der Blutzellentwicklungslinie bei Säugern (Stammzelle - Proerythroblast - Erythroblast - Normoblast - Retikulozyt - Erythrozyt) wird der Kern bereits im Retikulozytenstadium inaktiviert und ausgeschleust. Der Retikulozyt enthält die zur Proteinsynthese nötigen Polyribosomen, mRNA und Mitochondrien (mit Citratcyklus und Atmungskette) und hat neben der Synthese von Hämoglobin und anderen Zellbestandteilen auch die Aufgabe der Inaktivierung und Eliminierung zellulärer Organellen (Rapoport et al. 1974). Er wird normalerweise zur Mitte seiner ca. viertägigen

Entwicklungsphase aus dem Knochenmark in den Kreislauf entlassen (Harris & Kellermeyer 1972). Der reife Säugerythrozyt dagegen hat die Fähigkeit zur Hb-synthese verloren, ihm fehlen neben dem genetischen Material (DNA) auch die intrazellulären Bestandteile (Endoplasmatisches Reticulum, Polysomen, Mitochondrien, RNA) und die Stoffwechselwege (Citratzyklus, Proteinsynthese) dazu, die der kernhaltige Fischerythrozyt auch im reifen Stadium beibehält. So kann letzterer seine Syntheseaktivität aufrechterhalten und den äußeren Bedingungen anpassen, während der Säugerythrozyt sich zu einem hochspezialisierten Funktionselement der Sauerstoffversorgung von Gewebe und Organen entwickelt hat.

Im Laufe des Alterns im Kreislauf scheinen diese Organellen auch im Fischerythrozyten abzunehmen (Seakhon & Beams 1969, Yamamoto & Iuchi 1976, Lane et al. 1982), doch berichten auch diese Autoren von einer "Akkumulation" von Hämoglobin. Ebenso weisen die zahlreichen Kernporen in allen Karpfenerythrozyten (Schindler, unveröffentlichte Untersuchungen mit Gefrierbruch) und die trotz Verminderung der Organellen gefundene kontinuierliche Zunahme von Nucleosid-triphosphaten während des Alterns in Forellenerythrozyten (Lane 1984) auf eine allgemein weiterbestehende anabole Aktivität hin. Ferner ist anzumerken, daß die mikroskopische Detektion von Ribosomen und Mitochondrien in hämoglobinreichen Zellen schwierig ist. Generell können morphologische Kennzeichen (Form, Größe und Struktur von Zelle und Kern) lediglich ein Hinweis auf das Altersstadium des Erythrozyten sein. Die Grenze zwischen unreifen und reifen Erythrozyten ist auf diese Weise nicht eindeutig zu ziehen.

Sicher sind die individuellen Unterschiede innerhalb der Einzelerythrozyten und der Karpfen, wie schon öfters erwähnt, groß. Darüberhinaus kann auch von der besten Zelltrennung nach Dichte, Form und Größe keine absolute Altersauftrennung erwartet werden. Ebenso könnten metabolische Stimuli zu einer

starken Hämoglobinsynthese und einem im Vergleich zum Älterwerden übermäßigen Dichteanstieg der jungen Zellen führen. Doch auch unter diesen Einschränkungen und der Annahme, daß die Hämoglobinsynthese in frühen Zeiten des peripheren Stadiums stoppen kann, kann davon ausgegangen werden, daß generell die Zellen, die mehr Hämoglobin gebildet haben, schwerer und älter sind. Ohne eine hochgradige Anreicherung alter Zellen in den unteren Fraktionen des Dichtegradienten wären die Ergebnisse nicht erklärbar.

#### 4.2.3. Korrelation Dichte - Alter des Erythrozyten und Glycinverwertung

Daß dieser mit zwei verschiedenen, voneinander unabhängigen Methoden festgestellte Anstieg des Hämoglobingehalts nicht nur mit der Zunahme der Dichte des Karpfenerythrozyten, sondern auch mit dessen Alter korreliert (s. Fragestellung Nr. 3 der Einleitung), belegt der in vivo Versuch mit radioaktivem Glycin.

In der Vergangenheit wurden verschiedene Isotopen als Marker für rote Blutzellen verwendet:

Eisen ( $\text{Fe}^{59}$ ) bietet sich als essentieller Hämbestandteil an (Borun et al. 1957, Hoffman 1958, Prankerd 1958, Rigas & Koler 1961, Garby & Hjelm 1963, Danon & Marikovsky 1964, Prentice & Bishop 1965, Bishop & Prentice 1966, Piomelli et al. 1967), hat jedoch eine niedrige Halbwertszeit (45 d) und wird zur Neusynthese von Hb nach dem Absterben der Erythrozyten reutilisiert (Hoffman 1958, Bishop & Prentice 1966, Piomelli et al. 1967, Ebaugh & Ross 1985).

Diisopropylfluorophosphat ( $\text{DFP}^{32}$ ), das an Cholinesterase der Plasmamembran und andere intrazelluläre Bestandteile bindet (Bove & Ebaugh 1958, Cline & Berlin



1963, Sears & Weed 1969), hat den Nachteil der extremen Giftigkeit und des schnellen Abbaus (Ebaugh & Ross 1985).

Selten eingesetzt wurden Mangan ( $Mn^{41}$ ) (Borg & Cotzias 1958) und Methionin-Selen<sup>75</sup> (Penner 1966).

Chrom ( $Cr^{51}$ ), das vor allem an die  $\beta$ -Ketten von Hb bindet, wird standardmäßig für die Bestimmung der Lebensdauer von Säugererythrozyten verwendet (Heisterkamp & Ebaugh 1962, Pearson 1963). Auf Grund der kurzen Halbwertszeit (28 d), der kontinuierlichen Elution eines kleinen Teils des zugeführten und an Hb gebundenen Chroms (Ebaugh et al. 1953, Cline & Berlin 1963, Ebaugh & Ross 1985) und der unterschiedlichen Aufnahmeneigung junger und alter Zellen (Walter 1963, Danon et al. 1966) bietet sich  $Cr^{51}$  für diese Langzeituntersuchungen an Karpfenerythrozyten verschiedenen Alters nicht an. Darüberhinaus wird eine zellschädigende Wirkung in höheren Konzentrationen diskutiert (Koutras et al. 1965).

Glycin dagegen (verwendet werden sowohl das  $C^{14}$ ,  $N^{15}$  wie das  $H^3$ -Isotop, Shemin & Rittenberg 1946a, 1946b, Berlin et al. 1951, Hevesy et al. 1964, Piomelli et al. 1967), bietet mit seiner langen HWZ (5760 a), seiner gut und einfach meßbaren  $\beta$ -Strahlung, seiner anabolen Verwertung in den Erythrozyten während der Hb-synthese, der fehlenden Beeinträchtigung von Erythrozytenstruktur und -funktion viele Vorzüge. Darüberhinaus wird es sowohl in die Häm-Gruppe wie in die Globinketten eingebaut und verspricht vielfältige Untersuchungsrichtungen. Durch Injektion (i.v., i.m., i.p.) von Glycin lassen sich bei Säugern die jungen Erythrozyten markieren, in die der Marker im blutbildenden Organ eingebaut wird und die dann in den Kreislauf entlassen werden (Garby & Hjelm 1963, Bishop & Prentice 1966). Gegenüber dieser Applikationsweise hat die vorgestellte in vitro-Markierung mit anschließender Reinjektion den Vorteil, daß kein Markerdepot in Plasma, Gewebe oder Organen des Versuchstiers entsteht, aus dem



ständig Isotop nachgeliefert wird.

Daß auch im Retikulozyten des peripheren Säugerbluts (als Vorstufe des Erythrozyten) und unreifen Vogelerythrozyten Hb-synthese stattfindet, zeigt die in vitro-Aufnahme von Glycin, Histidin und  $\text{Fe}^{59}$  in Hämoglobin (Walsh et al. 1949, Kassenaar et al. 1957, Morell et al. 1958, Piomelli et al. 1967). In meinen Untersuchungen deutet die nach in vitro-Inkubation von Humanerythrozyten mit  $\text{C}^{14}$ -Glycin leicht erhöhte Radioaktivität in den jüngsten Erythrozyten, sowie die geringfügige Radioaktivität in den Hb-fractionen im Eluat der Gelfiltration möglicherweise auf eine Hb-synthese in den Human-Retikulozyten hin (s. 3.5., 3.6.). Die in den Humanerythrozyten verschiedener Dichte und im Plasma etwa gleich hohe Radioaktivität spricht aber für eine Verteilung von Glycin innerhalb und außerhalb der Membran nach einem Mechanismus der (passiven) erleichterten Diffusion oder des aktiven Transports (z.B. Symport unter Beteiligung von  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase), wie für Glucose und Aminosäuren bekannt. Daß jedenfalls Glycin hier nicht in nennenswertem Umfang zur Hb-synthese verwendet wird, zeigt die Gelfiltration.

Grundsätzlich läßt sich über eine selektive Markierung der jüngsten Erythrozyten das Altern dieser Zellpopulation verfolgen, wenn im Laufe mehrerer Monate Blut entnommen, fraktioniert und die Radioaktivität in jeder Fraktion bestimmt wird. Dann verschiebt sich nämlich im Histogramm die Säule mit der größten Radioaktivität von der Fraktion geringer Dichte zur Fraktion größter Dichte, was "in vivo" die Korrelation Dichte - Alter belegt und in diesen Versuchen beim Karpfen auch der Fall ist (s. 3.4.).

Darüberhinaus liefern die Werte und das entsprechende Histogramm nach der 1. Blutentnahme (mit Radioaktivität in allen Fraktionen) die Information, daß das exogen zugeführte Glycin zwar von den jungen Zellen in deutlich höherem Maße als von

den älteren, aber grundsätzlich von allen Karpfenerythrozyten aufgenommen und verwertet werden kann. Natürlich kann eine geringfügige Radioaktivität in sämtlichen Fraktionen allein durch die theoretisch und praktisch nicht zu verhindernde Abweichung von einer diskreten Fraktionierung in Blutzellen definierten Alters (Seaman et al. 1980) zustandekommen. Die gleichmäßige Entwicklung der Histogramme während des Untersuchungszeitraums illustriert jedoch die Reproduzierbarkeit der Auftrennung mit der durchgeführten Methode (in den Versuchen mit 10 Karpfen traten nie zweigipflige oder in der zeitlichen Aufeinanderfolge unregelmäßig veränderte Histogrammbilder auf).

Die Bildreihen der 5 Fische unter "Reservebedingungen" unterscheiden sich von denen der 5 Fische unter "Aktivbedingungen" darin, daß die Neubildung und Alterung der roten Blutzellen bei Fischen unter Reservebedingungen länger dauert, erkennbar an der langsameren Wanderung des Radioaktivitätspeaks in diesen Histogrammen. Der suppressive Effekt der Reservebedingungen auf die Erythropoiese (s. auch Zanjani et al. 1969, Chudzik & Houston 1983) wird durch Erhöhung von Temperatur, Futterangebot und Bewegungsfreiraum (nach 110 Tagen) aufgehoben. Lane & Tharp (1980) und Chudzik & Houston (1983) konstatierten, daß bei Forellen bzw. Goldfischen nach Blutentnahme die Mechanismen, die zur Ausgliederung der alten Zellen führen, eingeschränkt sind, um die verminderte Sauerstoffkapazität auszugleichen. Im Rahmen dieser flexiblen Regulation der Erythrozytenlebensdauer (s. Versuche an Schleien, *Tinca vulgaris*, Hevesy et al. 1964) und der - bereits in den Vorversuchen zu Tage getretenen - großen interindividuellen Streuungen von hämatologischen Parametern ist der Karpfen fähig, große Unterschiede in seinen äußeren Lebensbedingungen zu tolerieren und seinen Stoffwechsel entsprechend anzupassen (s. auch Walsh 1984).

Zum Endpunkt der Versuche läßt sich aus den Histogrammen ableiten, daß aus abgestorbenen Erythrozyten eine gewisse

Wiederverwertung von Glycin zur Hb-synthese stattfindet. Während Häm komplett über Leber, Galle und Darm abgebaut und ausgeschieden wird (Harris & Kellermeyer 1972), können die Aminosäuren des Globin (über den Aminosäurepool) und Eisen wieder in Hämoglobin eingebaut werden. Piomelli et al. (1967) und Seaman et al. (1980) fanden bei Säugern keine Reutilisierung exogen zugeführten radioaktiven Glycins (im Gegensatz zu Eisen), Hevesy et al. (1964) schlossen diese für  $C^{14}$ -Glycin bei Schleien nicht aus.

#### 4.2.4. Hämoglobinsynthese im Karpfenerythrozyten in vitro

Die theoretisch denkbare Möglichkeit, daß bei den vorgestellten Karpfenexperimenten Glycin lediglich während der in vitro-Inkubation in die Zelle aufgenommen wurde und nach Reapplikation in den Kreislauf über Umwege (Plasma, hämatopoietische Gewebe) im Hämoglobin neugebildeter Zellen erschien, wird durch die Gelfiltration unmittelbar nach in vitro-Inkubation ausgeschlossen (s. 3.6.). Hier taucht nämlich im Eluat ein bedeutender Anteil der Radioaktivität in den Hb-fractionen auf, es fand also Hb-synthese in vitro statt, während bei der analogen Behandlung von Humanblut-hämolysat zwei deutlich getrennte Peaks für Radioaktivität und Hb zustandekamen. Die Gelfiltration mit Karpfenblut-hämolysat, 35 Tage nach Inkubation und Reapplikation, zeigt dann nur noch einen gemeinsamen Peak für Hb und Radioaktivität, so daß also bis dahin die Anteile niedermolekularer radioaktiver Verbindungen in der Zelle verschwunden sind.

Die isoelektrische Fokussierung des Karpfenhämoglobins (s. 3.6.) ergibt 3 Hauptbanden, was mit früheren elektrophoretischen Untersuchungen (Gillen & Riggs 1972, Weber & Lykkeboe 1978, Albers et al. 1981) und neueren HPLC-Messungen unseres Arbeitskreises (Wurm 1988) übereinstimmt. Bei den

$C^{14}$ -Glycin Versuchen sind sie alle drei radioaktiv markiert, was darauf hinweist, daß sie auch während der Inkubation in vitro synthetisiert worden sind.

In den unabhängig davon durchgeführten IEF- Versuchen mit Erythrozyten verschiedener Dichte- und Altersfraktionen (s. 3.7.) fanden sich keinerlei Hinweise auf unterschiedliche Hb-Banden und eine Synthese unterschiedlicher Hämoglobine in verschieden alten Erythrozyten.

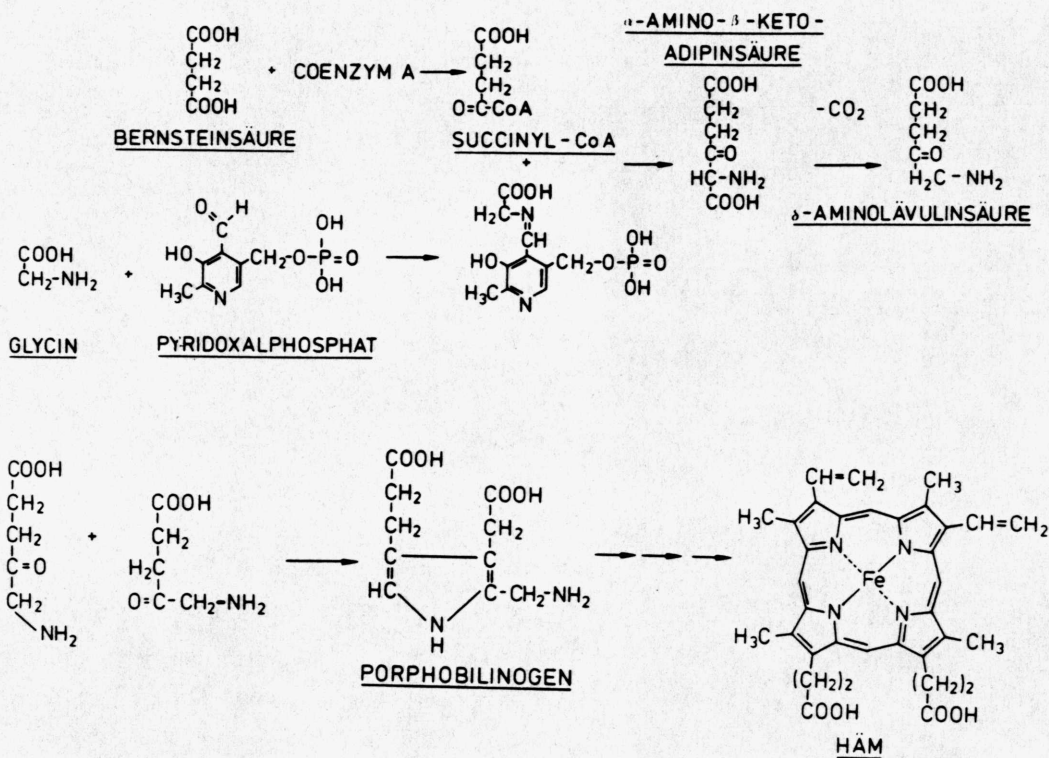


Abb. 14 : Hämsynthese

Die weitere Aufspaltung radioaktiven Hämoglobins in Häm und Globin zeigt die Anwesenheit von  $C^{14}$  in Häm und Globin (s. 3.6.). Glycin wird also, wie theoretisch möglich (Abb. 14), sowohl für die Synthese des Porphyrinringgrundgerüsts von



Häm wie der Globinketten (Struktur bei Grujic-Injac et al. 1980) unter diesen Bedingungen in vitro auch wirklich verwendet.

Resümee (s. Fragestellung Nr. 4, Einleitung):

Die Versuche mit den fraktionierten Blutzellen liefern verschiedene Anhaltspunkte dafür, daß im Karpfenerythrozyten, auch während er sich in seinem "reifen Stadium" frei im Kreislauf befindet, Hämoglobinsynthese stattfindet (in vivo). Ebenso erfolgt Hämoglobinsynthese im Karpfenerythrozyten unter in vitro- Bedingungen.

#### 4.3. Einflüsse auf die Zellalterung beim Humanerythrozyten

Die sehr komplex geführte Diskussion zur Alterung speziell des Humanerythrozyten erstreckt sich im wesentlichen auf drei untereinander vernetzte Gesichtspunkte, die als hauptverantwortliche Faktoren zur begrenzten Lebensdauer, Veränderung und zum Absterben der roten Blutzelle führen.

##### 4.3.1. Die Verminderung der metabolischen Aktivität

Im Laufe der Alterung des Erythrozyten wird die Umsatzrate seiner energieliefernden Stoffwechselprozesse - der dominierenden anaeroben Glykolyse (ca. 90% Anteil) und des oxidativen Pentosephosphatwegs (PPW) (ca. 10% Anteil) -, sowie der daran beteiligten Enzyme reduziert (Marks et al. 1958, Harris & Kellermeyer 1972, Linman 1975). Damit verbunden sind die verminderte Ausstattung der älteren Zelle mit ATP, 2,3-DPG, Pentosephosphaten und reduzierten Nukleotiden (v.a. NADPH aus dem PPW).

Da der Säugererythrozyt während seiner Reifung den Kern und die mRNA und damit die Fähigkeit zur Neusynthese von Proteinen verliert, kann davon ausgegangen werden, daß ein bestimmter Grad der Veränderung und Alterung essentieller Enzyme und des Verlusts des einmal definitiv angelegten Enzymbestands, mit dem die Zelle während ihrer Lebenszeit haushalten muß, zu einer schrittweisen Schwächung der metabolischen Kapazität und Energieproduktion führt.

Die Akkumulation von altersveränderten, teil- oder inaktiven Enzymen stellt nach der "error-catastrophe"-Theorie (Orgel 1963, Gershon & Gershon 1970) einen ständig wachsenden Streß für die Zelle dar.

Enzyme können während ihres Alterns z. B. Veränderungen erfahren in

- ihrer Aktivität (in diesem Zusammenhang sind die in Tab. 15 angegebenen Veränderungen von Enzymaktivitäten und damit in Verbindung stehenden Metabolitenkonzentrationen im alternden Säugererythrozyten von Interesse)
- ihrer Struktur (Fornaini et al. 1969, Sadana & Henley 1985)
- ihren kinetischen und thermodynamischen Eigenschaften (Fornaini et al. 1969, Fornaini et al. 1978, Magnani et al. 1979)
- ihrer elektrophoretischen Mobilität und ihrem isoelektrischen Punkt (Fornaini et al. 1978).

Es wäre an dieser Stelle überinterpretiert, aus den Literaturquellen Zahlenwerte über das Maß der Abnahme von Enzymaktivitäten im Laufe der Zellalterung anzugeben und zu vergleichen. Diese Werte, sowie die mathematisch dargestellte Korrelation hängen von der Durchführung und Effektivität der Zelltrennmethode ab. Überhaupt ist die mathematische Aufbereitung - Erstellung der Funktion, Interpolation auf die maximale und minimale Enzymaktivität zum Tag 0 bzw. 120, Errechnung der  $T_{1/2}$  (Galbraith & Watts 1980, Seaman et al.

1980, Sadana & Henley 1985, Lindena et al. 1986) - heftig umstritten (Beutler 1985, Piomelli et al. 1986, Beutler 1986). Eindeutig kann jedoch festgestellt werden, daß die Aktivität vieler Enzyme in den Retikulozyten deutlich erhöht ist (Beutler 1985), hier auf Grund der Anwesenheit eines ATP-abhängigen proteolytischen Systems (Boches & Goldberg 1982, Rapoport 1985) stark abfällt und während der Lebensdauer des Erythrozyten mehr oder weniger stark kontinuierlich sinkt.

<b>Tab. 15 : Veränderungen von Enzymaktivitäten und Metabolitenkonzentrationen während des Alterns des Säugererythrozyten laut</b>	
(1) Abraham et al. 1978	(2) Baur et al. 1982
(3) Bernstein 1959	(4) Beutler 1975
(5) Chapman & Schaumburg 1967	(6) Cohen et al. 1976
(7) Fornaini et al. 1969	(8) Galbraith & Watts 1980
(9) Glass & Gershon 1981	(10) Glass & Gershon 1984
(11) Harris & Kellermeyer 1972	(12) Imanishi et. al. 1986
(13) Lindena et al. 1986	(14) Löhr et al. 1958
(15) Löhr & Waller 1962	(16) Magnani et al. 1983
(17) Miwa 1979	(18) Pfeffer & Swislocki 1976
(19) Sass et al. 1964	(20) Seaman et al. 1980
(21) Trautsch et. al. 1981	(22) Waller et al. 1974
<b>deutliche oder leichte Aktivitätsminderung von:</b>	
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	2, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 20
6-Phospho-gluconat-Dehydrogenase	8, 11, 17
Hexokinase	4, 5, 11, 13, 16, 17
Phosphohexose-Isomerase	3, 11, 17, 20
Phosphofructokinase	17, 20
Aldolase	3, 4, 5, 11, 13, 17, 20
Triosephosphat-Isomerase	11, 20

Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	14, 17, 20
Phosphoglycerat-Kinase	20
Pyruvatkinase	5, 11, 13, 17, 20
Transketolase	17
Isocitrat-Dehydrogenase	17
Adenylatcyclase	18
Proteinkinase	18
Acetylcholinesterase	4, 6, 11, 13, 17, 21
GOT	4, 5, 11, 13, 17, 19
Catalase	2, 10, 11, 17
Glutathion-Peroxidase	2, 10, 12
Superoxid-Dismutase	2, 9
Keine oder nur geringe Verminderung von:	
Lactat-Dehydrogenase	11, 13, 15, 20
Malat-Dehydrogenase	13
Glutathion-Reduktase	1, 2, 8, 10, 11, 12, 22
Methämoglobin-Reduktase	11
Glutathion (reduziert)	1, 2, 11, 12, 16, 22
Zunahme von:	
Glutathion (oxidiert)	12
Methämoglobin	12

Einschränkend muß festgehalten werden, daß sich die in vivo Situation (Effektoren, Inhibitoren, Stoffwechselkaskaden) enorm von den idealen Bedingungen einer in vitro- Bestimmung (Substratsättigung, pH-Optimum) unterscheidet. Letztere führt bei den meisten glykolytischen Enzymen während der Zellebenszeit zu potentiellen Aktivitäten, die weit über den aktuellen metabolischen Raten liegen. Beispielsweise ist die



in vitro gemessene Aktivität der Pyruvatkinase, obwohl sie während des Alterns des Erythrozyten stark abfällt, stets höher als im jeweiligen Status des glykolytischen Systems in vivo erforderlich (Seaman et al. 1980).

Seaman et al. (1980) ermittelten eine um den Faktor 4 sinkende Glucoseverwertung und eine um den Faktor 2.5 sinkende Laktatbildung während der Erythrozytenlebensdauer (gemessen bei steady-state Bedingungen mit physiologischen Werten für Glucosekonzentration,  $O_2$ - und  $CO_2$ - Partialdruck, pH und Temperatur). Während des Alterns verschob sich der Laktat/Glucose (L/G)- Quotient von 1.4 bei den jüngsten Zellen (0. Tag) auf 2.3 bei den ältesten (120. Tag), was auf eine Beteiligung des PPW und 2,3-DPG-shunts an der Glucose-verstoffwechslung in den jüngsten Zellen und eine ansteigende Dominanz des Embden-Meyerhof Abbaus bei den alternden Zellen hinweist. Bei metabolischer Stimulierung der Glykolyse mit Phosphat bzw. des PPW mit Methylenblau stiegen Glucose-verwertung und Laktatbildung an, der L/G- Quotient war (unter Phosphatzusatz) 1.3 bei den jüngsten und 2.1 bei den ältesten Erythrozyten bzw. (unter Methylenblau) 0.6 und 2.1; die jungen Zellen waren im Gegensatz zu den alten auf beide metabolische Stimuli ansprechbar. Die Autoren schlossen daraus, daß die alten Erythrozyten eine niedrige und fixe Glucoseverwertungsrate haben, die in Streßsituationen nicht erhöht werden kann. Ob das altersbedingte Absinken der Glykolyserate für die Beschränkung der Zellebensdauer verantwortlich ist, bleibt ungewiß, doch scheint der fortschreitende Verlust der metabolischen Flexibilität gegenüber Streßsituationen seinen Teil dazu beizutragen. Ähnliche Ergebnisse berichten Chapman & Schaumburg (1967) und Bernstein (1959): die alten Erythrozyten lieferten einen L/G-Quotienten von ca. 2, was für eine rein glykolytische Verstoffwechslung der Glucose im Gegensatz zum deutlichen PPW-anteil bei den jüngsten Erythrozyten spricht.

Ein Absinken des ATP- und 2,3-DPG-gehalts in alten Erythrozyten in vivo wird ebenfalls berichtet (Löhr et al. 1958, Bartosz et al. 1982, Cohen et al. 1976, Magnani et al. 1983). Dies kann zur Altersanfälligkeit des Erythrozyten beitragen, da ATP als Index für das Energiepotential der Zelle wesentlich an der Aufrechterhaltung der Enzymaktivitäten und der Membranstruktur beteiligt ist (Nakao et al. 1960, Beutler 1975).

Andere Werte für das Maß der Glykolysereduktion mit und ohne metabolische Stimuli und des PPW-anteils (Magnani et al. 1983), sowie der ATP-gehaltsveränderung (Syllm-Rapoport et al. 1969, Kirkpatrick et al. 1979) während des Alterns werden von den Autoren selbst auf unterschiedliche Aufbereitungs- und Zelltrennmethoden zurückgeführt.

#### 4.3.2. Die Verminderung des reduktiven Potentials

Die fehlende Aufrechterhaltung des reduktiven Potentials (NADPH, NADH, GSH) in der älteren Zelle in Zusammenhang mit der Verminderung von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Glutathion-Reduktase, Glutathion-Peroxidase, Catalase, Superoxid-Dismutase, Methämoglobin-Reduktase trägt über

- a) Lipidperoxidation in der Zellmembran
- b) oxidativer Denaturierung von Zellproteinen
- c) Oxidation des Hämoglobins

mit dazu bei, daß die Zelle ausgeschleust und abgebaut wird (Jacob & Jandl 1962, Jacob & Jandl 1966, Tannert et al. 1977, Jain et al. 1983, Glass & Gershon 1984, Imanishi et al. 1986).

Die Fähigkeit der Reduktion von oxidiertem Glutathion (GSSG) hängt von der Anlieferung reduzierter Nucleotide (v.a. aus dem PPW) ab.

a) Reduziertes Glutathion (GSH) ist wesentlich beteiligt (Al-Turk et al. 1987) an der Entstörung von elektrophilen und alkylierenden Agentien - reaktiven Sauerstoffspezies ( $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $^1\text{O}_2$ , Hydroperoxide) -, die über Radikalreaktionen die Integrität der Zellmembran angreifen (Tannert et al. 1977, Imanishi et al. 1986). Diese führen zu Lipidperoxidation, Abspaltung von Fettsäuren, Membrandefekten, Depolymerisation von Polysacchariden und Nucleinsäuren (Wdziejczak et al. 1982, Jain et al. 1983). Das Endprodukt der Lipidperoxidation Malondialdehyd (MDA) selbst kann über Schiffbasenbildung Proteine und Phospholipide quervernetzen (Jain & Hochstein 1980) und Hämoglobin an die Membran binden (Goldstein et al. 1980). In vitro wurden außerdem folgende Effekte von MDA festgestellt: erhöhte Membranrigidität, Dehydratisierung und Kaliumverlust, verminderte  $\text{Cr}^{51}$ -Beständigkeit in vivo (Jain et al. 1983). Außer an der Produktion von MDA (Baur et al. 1982, Glass & Gershon 1984) ist die Lipidperoxidation erkennbar an der Verminderung von Arachidonsäure und Eicosahexaensäure (Munn & Crosby 1961, van Gastel 1965, Einsele et al. 1987), sowie von Glutathion (Baur et al. 1982) und der Freisetzung von Alkanen (Einsele et al. 1987).

b) Glutathion schützt allgemein SH-Gruppen von Membran- und Strukturproteinen, Enzymen und Hämoglobin vor Oxidation (Jacob & Jandl 1966, Wdziejczak et al. 1982).

c) speziell im Falle von Hämoglobin können durch oxidative Schädigung Hb-Disulfide über GSSG, Sulf-Hb-Verbindungen, irreversibel denaturiertes Hämoglobin, polymerisierte Produkte und Heinzkörperchen auftreten (Jandl et al. 1960, Huisman & Dozy 1962, Jacob & Jandl 1966, Tannert et al. 1977). Desweiteren sind als Veränderungen im alternden Hämoglobin beschrieben: Zunahme von Methämoglobin (Löhr & Waller 1962, Imanishi et al. 1986), Auftreten von zusätzlichen

elektronegativen Komponenten in der Elektrophorese (Rosa et al. 1960) und erhöhte Affinität für Sauerstoff (Edwards & Rigas 1967). Die Reduktion von Methämoglobin zu Hämoglobin ist an die strukturelle Integrität der Erythrozyten und die Funktion des Kohlenhydrat-Stoffwechsels zur Anlieferung reduzierter Pyridinnucleotide gebunden. Die im Säugerythrozyten primär dafür zuständige NADH-Methämoglobin-Reduktase ist auch im kernhaltigen Erythrozyten dominierend (Ito et al. 1984, Scott & Harrington 1985). Daneben sind am Schutz des Hämoglobins vor Oxidation durch reaktive Sauerstoffspezies u.a. Catalase, Superoxid-Dismutase und Peroxidase beteiligt.

Ebenfalls wird diskutiert, daß die Autoxidation von Hämoglobin (aus  $\text{HbO}_2$  entsteht  $^-\text{O}_2$ ) die freie Radikalreaktion starten kann (Misra & Fridovich 1972, Jain & Hochstein 1980). Diese Theorie geht zurück auf Untersuchungen von Weiß (1964), Viale et al. (1964), Politzer (1968) und Peisach et al. (1968), die bei der Bindung von Sauerstoff an Hämoglobin einen Elektronentransfer auf das Sauerstoffmolekül als wahrscheinlich erscheinen lassen.

#### 4.3.3. Zellmembranveränderungen

Mit den bisher geschilderten Vorgängen hängt die Veränderung von biochemischen und mechanischen Eigenschaften des Erythrozyten zusammen, die zur Ausschleusung der Zelle führen kann. So kann die Peroxidation von Membranlipiden, die oxidative Denaturierung von Membranproteinen und die Polymerisation von Membrankomponenten eine Verringerung der Verformbarkeit, der Mikrozirkulationsfähigkeit und der mechanischen und osmotischen Widerstandsfähigkeit der Zelle bewirken (Tannert et al. 1977, Jain & Hochstein 1980). Die Eliminierung der zum Absterben verurteilten Zellen erfolgt durch Makrophagen des RES (speziell in Milz, Leber und



Knochenmark) über Registrierung rheologischer oder biochemischer Strukturmerkmale der Erythrozytenmembran, wahrscheinlich unter Beteiligung zirkulierender Antikörper. Neben der Formveränderung kann die verminderte Oberflächenladung alter Erythrozyten zur Phagozytose dieser Zellen führen (Seaman et al. 1977). Neuere Untersuchungen weisen ein von band 3 abstammendes Protein, ("senescent cell antigen") nach, das in alten Erythrozyten exprimiert wird. Dieses kann von zirkulierendem Immunglobulin G erkannt, und der entstehende Immunkomplex per Phagozytose von Makrophagen eliminiert werden (Kay et al. 1983).

Folgende biochemischen Membranveränderungen wurden beobachtet:

- Abnahme von Spectrin band 1 und 2 (Jain & Hochstein 1980)
- Veränderungen an band 3 (Kay et al. 1983)
- Abnahme von band 4.1b und Zunahme von band 4.1a (Morrison et al. 1983)
- Abnahme von Proteinen, membranständigen Enzymen (z.B. AChE) (Cohen et al. 1976, Trautsch et al. 1981, Fischbeck et al. 1982)
- Zunahme von Proteinpolymeren (Jain & Hochstein 1980)
- Abnahme von Phospholipiden und Cholesterol (Pranker 1958, Cohen et al. 1976)
- Abnahme von N-acetylneuraminsäure, N-acetyl-glucosamin, N-acetyl-galactosamin, Galactose (Baxter & Beeley 1978, Fischbeck et al. 1982).

Resümee (Zsf. zu 4.3.):

Diese komplexen Altersveränderungen im Säugererythrozyten,

- die Schwächung der metabolischen Aktivität und der Flexibilität gegenüber Stresssituationen,
- die oxidative Zerstörung von Membran- und intrazellulären Komponenten auf Grund mangelhafter Detoxifizierung

reaktiver Sauerstoffspezies,

- und die Veränderung rheologischer und biochemischer Struktureigenschaften

bedingen und ergänzen sich in ihrer Wirkung gegenseitig und dürften wohl gemeinsam die begrenzte Lebensdauer des Erythrozyten zur Folge haben.

#### 4.4. Zellalter und Enzymaktivitäten beim Karpfen- und Humanerythrozyten

##### 4.4.1. Acetylcholinesterase

Als Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) (AChE) wird die im Erythrozyten vorliegende spezifische Cholinesterase verstanden (doch kommen auch im Erythrozyten geringe Mengen unspezifische, und im Serum neben den überwiegenden unspezifischen spezifische Cholinesterasen vor; Bergmeyer 1974).

AChE ist membrangebunden (Ott et al. 1975, Gailbraith & Watts 1981, Grzelinska et al. 1983), und dürfte damit an Aufgaben der Membran (Struktur und Permeabilität) beteiligt sein, obwohl die Klärung der Funktion noch aussteht (Herz et al. 1968, Skau 1985). Eine Hemmung der AChE-Aktivität in zirkulierenden und sich entwickelnden Erythrozyten in vitro zeigte keinen Einfluß auf die Lebensdauer (Metz et al. 1961).

Die Aktivität von AChE sinkt mit dem Alter des Humanerythrozyten (Allison & Burn 1955, Herz 1975, Cohen et al. 1976), ja sie eignet sich besonders gut als Marker für das Erythrozytenalter. Diese Tendenz wurde hier in den Humanblutfractionen bestätigt (Tab. 12b).

Beim Karpfenerythrozyten jedoch scheint diese spezifische AChE im Erythrozyten nicht vorzukommen. Die in Erythrozyten-

fraktionen (mit oder ohne Tensidzusatz), Plasma und Vollblut gemessenen Aktivitäten bewegen sich in einem kaum meßbaren Bereich (ca. 100 I.U./l gegenüber ca. 5000 I.U./l bei Humanblut) und zeigen untereinander keine signifikanten Unterschiede (Tab. 12a). Ähnliches wird von Forellen-erythrozyten berichtet (Tilley et al. 1981): Weder im Blut, Erythrozyten, Erythrozytenhämolysat noch Plasma fanden sich meßbare Aktivitäten an spezifischer AChE (Messung bei 24°C, mit und ohne Saponinzusatz).

#### 4.4.2. Aspartat-Aminotransferase (GOT)

Aspartat-Aminotransferase (GOT; EC 2.6.1.1) eignet sich ebenfalls als guter Altersmarker (Sass et al. 1964, Fischer & Walter 1971) und auch hier (Tab. 14) bestätigt sich die Abnahme ihrer Aktivität in älteren Humanerythrozyten.

GOT spielt im Proteinstoffwechsel eine große Rolle. Sie katalysiert die Transaminierung von Aspartat in Glutamat (Abb. 15).

GOT ist über ihre Edukte und Produkte direkt am Citratzyklus beteiligt, der als metabolische Drehscheibe Bestandteile des Kohlenhydrat-, Protein- und Fett- Stoffwechsels ineinander überführt. Im Gegensatz zum reifen Säugererythrozyten ohne funktionierenden Krebszyklus und damit ohne metabolischen Nutzen dieses Enzyms (Chapman & Schaumburg 1967), kann die festgestellte Aufrechterhaltung der GOT-Aktivität im reifen Karpfenerythrozyten (Tab. 13) also durchaus eine wichtige Stoffwechselfunktion erfüllen. Gerade für die Hämsynthese ist ein aktiver Citratzyklus essentiell.

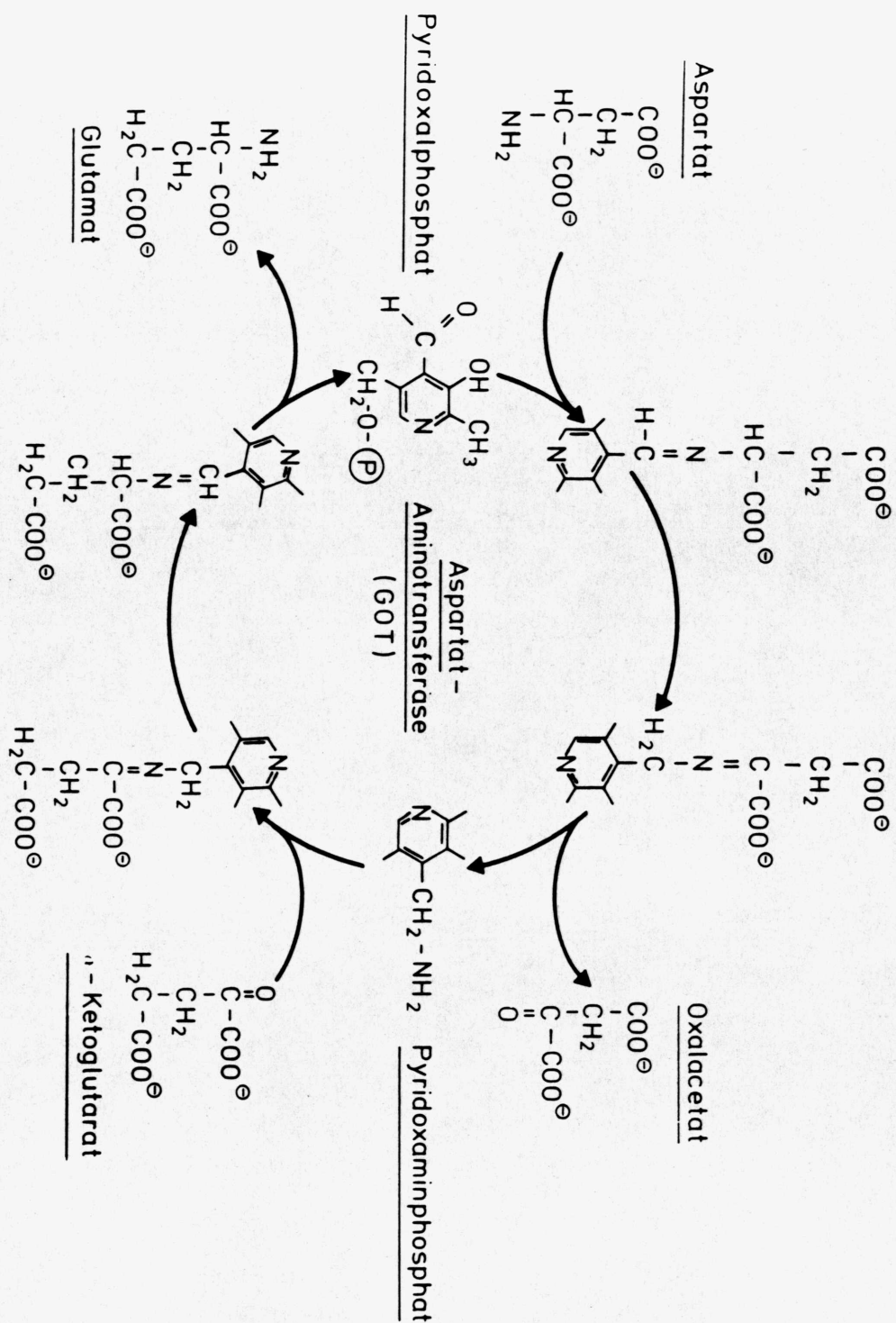


Abb. 15 : Transaminierung über Aspartat-Aminotransferase



#### 4.4.3. Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) (EC 1.1.1.49) wurde als Vertreter des Kohlenhydrat-Stoffwechsels gewählt. Sie katalysiert die Umsetzung

$\text{Glucose-6-P} + \text{NADP}^+ \longrightarrow \text{Gluconsäure-6-P} + \text{NADPH} + \text{H}^+$   
und stellt die Regulatorkontrolle des Pentosephosphatwegs (PPW) dar.

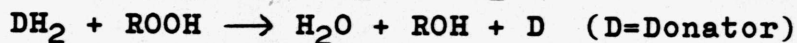
Ihre Aktivität sinkt mit dem Alter des Humanerythrozyten (Tab. 14) (s. Marks et al. 1958, Herz et al. 1968), außerdem verändern sich ihre physikochemischen und kinetischen Eigenschaften (Fornaini et al. 1969).

Beim Karpfenerythrozyten ist wiederum keine altersabhängige Verminderung der Enzymaktivität feststellbar (Tab. 13), auch hier möglicherweise wichtig für die Aufrechterhaltung des Stoffwechsels der metabolisch aktiven Zelle.

#### 4.4.4. Peroxidase

Von Peroxidase (EC 1.11.1.7) sind beim Karpfenerythrozyten extrem hohe Werte gemessen worden (Wdzieczak et al. 1982, Gabryelak et al. 1983), weswegen hier die Aktivität zusätzlich altersabhängig untersucht wird. Dabei ist innerhalb der sehr hohen Werte der verschiedenen Fraktionen keine signifikante Veränderung erkennbar (Tab. 13).

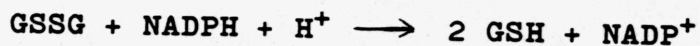
Da im Vergleich dazu die Aktivitäten von Catalase und Superoxid-Dismutase (SOD) (in Relation zum Humanerythrozyten) gering sind, wird Peroxidase als wesentliches Oxidationsschutzenzym angesehen:



Dieser Funktion kommt bei Fischen auf Grund ihres hohen Anteils an Fettgewebe und ungesättigten Fettsäuren sicher eine besondere Bedeutung zu (Wdzieczak et al. 1982).

#### 4.4.5. Glutathion-Reduktase

Glutathion-Reduktase (EC 1.6.4.2) katalysiert die Umsetzung:



und dient damit der Aufrechterhaltung einer physiologisch wichtigen GSH- Konzentration als reduktives Potential.

In der Literatur differieren hier die Angaben zu Aktivitätsveränderungen während des Alterns der Human-erythrozyten - keine Veränderung (Waller et al. 1974, Galbraith & Watts 1980) bzw. signifikante Verminderung (Baur et al. 1982, Imanishi et al 1986) -, was mit der Zahl und Auswahl der Probanden zusammenhängen kann. Ähnliche Tendenzen sind hier (Tab. 14; s. Einzelmeßreihen und Mittelwertreihe) erkennbar.

Interessanterweise ist bei den Karpfenerythrozyten hier erstmals eine statistisch belegbare Abnahme einer Enzymaktivität mit dem Zellalter feststellbar (Tab. 13). Dies dürfte auf Grund der Beteiligung dieses Enzyms am Schutz von Proteinen und Lipiden in Cytosol und Membranen vor oxidativen Einflüssen sicher zu einer schädigenden Wirkung auf die alternde Zelle beitragen.

Erstaunlicherweise ist das gleiche Phänomen, die schlagartige Aktivitätsverminderung der Glutathion-Reduktase in den ältesten Zellen, bei Messungen dieses Enzyms in menschlichen Fibroblasten (Mbemba et al. 1985) festgestellt worden. Diese Beobachtung war hier verbunden mit einem Gipfel der GSH-Konzentration vor dem Absterben der Zellen.

Resümee (zur Fragestellung Nr. 5 der Einleitung):

Aus den Ergebnissen der Enzymbestimmungen ist keine Verminderung der metabolischen Aktivität in alten Karpfen-

erythrozyten zu erkennen. Wie bereits an der Hämoglobinsynthese ausführlich diskutiert (4.2.), scheint also auch in dieser Hinsicht der Kohlenhydrat- und Protein-Stoffwechsel allgemein aufrechterhalten werden zu können, soweit diese Interpretation der Ergebnisse unter den bekannten Einschränkungen (s. 4.3.1.) gemacht werden kann.

Die mit dem Abfall der Aktivität von Glutathion-Reduktase mögliche oxidative Schädigung von intrazellulären Bestandteilen, Hämoglobin und Membrankomponenten könnte auch beim Karpfenerythrozyten eine von vielen verschiedenen Ursachen für seine begrenzte Lebensdauer darstellen.

#### 4.5. Ausblick:

Es wird hier ein Einblick in Stoffwechselleistungen und damit verbundene Alterungsvorgänge eines kernhaltigen Erythrozyten eines niederen Wirbeltieres gegeben. Diese Zelle hat den Vorteil, daß sie im Gegensatz zu anderen Geweben und Zellkulturen in einfacher Weise in großen Mengen und als Suspension einzelner Zellen einer homogenen Population gewonnen und gehandhabt werden kann. Auf Grund charakteristischer Ausstattung und Eigenschaften, die sie vom hochspezialisierten Säugererythrozyten unterscheidet, kann sie - mindest in begrenztem Umfang - als Modell einer stoffwechselaktiven Somazelle dienen.

In Anbetracht der vielfältig geführten Diskussion zu Zellalterung und -untergang sowie des großen Interesses an der Erkenntnis der daran beteiligten Mechanismen wäre es insofern lohnend, weitere Meßmethoden der Hämatologie, klinischen Chemie und Biochemie auf dieses Modell zu standardisieren und neue biochemische, biophysikalische, molekularbiologische und immunologische Untersuchungsverfahren darauf anzuwenden.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Diskussion zur Zellalterung, speziell des Humanerythrozyten, und der daran beteiligten Mechanismen ist in der Literatur allgemein von großem Interesse.

Ausgehend von den grundlegenden Unterschieden zwischen der roten Blutzelle niederer Wirbeltiere und den Säugerythrozyten, sollte in dieser Arbeit am Karpfenerythrozyten untersucht werden, in wie weit sich die strukturellen Besonderheiten dieser Zelle in ihrem Stoffwechsel und ihren biochemischen Eigenschaften manifestieren.

Aus cytologischen Beobachtungen ist bekannt, daß der reife Erythrozyt im Kreislauf des Karpfen neben Kern auch zahlreiche Organellen im Cytosol beibehält (z.B. Polyribosomen, Mitochondrien, Endoplasmatisches Reticulum, Golgi-Apparat).

Es wurde daher in Abhängigkeit vom Zellalter

- die Hämoglobinbildung in vivo und in vitro und
- an Hand beispielhafter Enzyme die metabolische Aktivität mit möglichen Auswirkungen auf die Zellalterung untersucht.

Aus den Versuchen können folgende Schlußfolgerungen gezogen werden:

1. Die für kernlose Säugerythrozyten bekannte Relation Dichte - Alter kann auch für die kernhaltigen Karpfenerythrozyten zur Fraktionierung der Blutzellen in verschiedene Altersstufen genutzt werden (Weiterentwicklung der Zentrifugationsmethode von Murphy 1973).



2. Jedoch steigen die hämatologischen Parameter MCV, MCH, MCHC beim Karpfenerythrozyten im Gegensatz zum Humanerythrozyten alle mit der Dichte an (Standardmethoden der klinischen Chemie). Das bedeutet, daß sich das spezifische Gewicht des Karpfenerythrozyten in erster Linie nicht wegen Volumenverminderung, sondern auf Grund von Akkumulation intrazellulärer Bestandteile erhöht.

3. Das vor allem dafür verantwortliche Anwachsen des Hämoglobingehalts mit dem Zellalter konnte durch Mikroskop-Cytophotometrie an Einzelzellen und radioaktiven Markierungsversuchen während der Lebensdauer der Zelle bestätigt werden; sogar unter in vitro-Bedingungen (Inkubation mit  $2\text{-C}^{14}$ -Glycin bei physiologischen Verhältnissen) wurde Hämoglobinsynthese gefunden (Gelfiltration, Isoelektrische Fokussierung mit Autoradiographie, Hämin- und Globinuntersuchung mit Flüssigkeits-Szintillationsmessung).

4. Diese Syntheseaktivität beim Karpfen ist, wie an verschiedenen Beispielen in der Literatur geschildert, in deutlichem Maße von den äußeren Faktoren (Lebensraum, Jahreszeit, Nahrungszustand, Temperatur, Sauerstoffpartialdruck, Wassereigenschaften, Streß, Blutverlust etc.) beeinflusst, was sich hier unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen ("Aktiv- und Reservebedingungen") bestätigt.

5. Die bei Humanerythrozyten als Altersmarker bekannten Enzyme Acetylcholinesterase, Aspartat-Aminotransferase, und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, sowie die Peroxidase zeigten in den fraktionierten Karpfenerythrozyten keine signifikanten Veränderungen; Acetylcholinesterase war außerdem intrazellulär kaum vorhanden; eine Verminderung einer bestimmten Stoffwechselaktivität war hier nicht erkennbar.

6. Glutathion-Reduktase dagegen fiel vor allem in den ältesten Karpfenerythrozyten in ihrer Aktivität deutlich ab und könnte somit als Altersmarker für diese Zellen dienen. Darüberhinaus enthält dieses Ergebnis die Information, daß intrazelluläre und Membranschädigungen auf Grund oxidativer Einflüsse bei dieser - in gewissem Umfang - metabolisch aktiven Zelle mit zur begrenzten Lebensdauer beitragen könnten.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Abraham, E.C., Taylor, J.F. & Lang, C.A. (1978). Influence of mouse age and erythrocyte age on glutathione metabolism. *Biochem. J.* 174, 819-825.
- Albers, C., Götz, K.H. & Welbers, P. (1981). Oxygen transport and acid-base balance in the blood of the sheatfish, *Silurus glanis*. *Respir. Physiol.* 46, 223-236.
- Albers, C., Götz, K.-H. & Hughes, G.M. (1983). Effect of acclimation temperature on intraerythrocytic acid-base balance and nucleoside triphosphates in the carp, *Cyprinus carpio*. *Respir. Physiol.* 54, 145-159.
- Albers, C. (1985). Gas transport properties of fish blood. In *Circulation, Respiration, and Metabolism* (ed. R. Gilles), pp. 82-90. Springer V., Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- Albers, C. & Götz, K.-H. (1985).  $H^+$  and  $Cl^-$  ion equilibrium across the red cell membrane in the carp. *Respir. Physiol.* 61, 209-219.
- Allison, A.C. & Burn, G.P. (1955). Enzyme activity as a function of age in the human erythrocyte. *Br. J. Haemat.* 1, 291-303.
- Al-Turk, W.A., Stohs, S.J., El-Rashidy, F.H. & Othman, S. (1987). Changes in glutathione and its metabolizing enzymes in human erythrocytes and lymphocytes with age. *J. Pharm. Pharmacol.* 39, 13-16.
- Bartosch, G., Tannert, Ch., Fried, R. & Leyko, W. (1978). Superoxide dismutase activity decreases during erythrocyte

aging. *Experientia* 34, 1464-1464.

Bartosz, G., Grzelinska, E. & Wagner, J. (1982). Aging of the erythrocyte. XIV. ATP content does decrease. *Experientia* 38, 575-575.

Baur, G., Jung, A. & Wendel, A. (1982). Die Aktivität des Glutathion-Redoxsystems in menschlichen Erythrozyten unterschiedlichen Alters. *Klin. Wschr.* 60, 867-869.

Baxter, A. & Beeley, J.G. (1978). Surface carbohydrates of aged erythrocytes. *Biochem. biophys. Res. Comm.* 83, 466-471.

Behring-Werke Diagnostika (1984), Kleine Praxis der Hämatologie, Behringwerke AG, Frankfurt/M.

Bergmeyer, H.U. (1974). Methoden der enzymatischen Analyse. 3. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim.

Bergmeyer, H.U. (1975). Neue Werte für die molaren Extinktionskoeffizienten von NADH und NADPH zum Gebrauch im Routine-Laboratorium. *Z. klin. Chem. klin. Biochem.* 13, 507-508.

Berlin, N.I., Meyer, L.M. & Lazarus, M. (1951). Life span of the rat red blood cell as determined by glycine-2-C<sup>14</sup>. *Am. J. Physiol.* 165, 565-567.

Bernstein, R.E. (1959). Alterations in metabolic energetics and cation transport during aging of red cells. *J. clin. Invest.* 38, 1572-1586.

Betke, K. & Savelsberg, W. (1950). Stufenphotometrische Hämoglobinbestimmung mittels Cyanhämoglobin. *Biochem. Z.* 320, 431-439.



- Beutler, E. (1975). Red cell metabolism - a manual of biochemical methods. 2nd ed.. Grune & Stratton, New York, San Francisco, London.
- Beutler, E. (1985). Annotation. How do red cell enzymes age? A new perspective. *Br. J. Haemat.* 61, 377-384.
- Beutler, E. (1986). Correspondence. How do red cell enzymes age? Hypothesis and facts. *Br. J. Haemat.* 64, 408-410.
- Bishop, C. & Prentice, T.C. (1966). Separation of rabbit red cells by density in a bovine serum albumin gradient and correlation of red cell density with cell age after in vivo labelling with  $^{59}\text{Fe}$ . *J. cell. comp. Physiol.* 67, 197-207.
- Blaxhall, P.C. & Daisley, K.W. (1973). Routine haematological methods for use with fish blood. *J. Fish Biol.* 5, 771-781.
- Boches, F.S. & Goldberg, A.L. (1982). Role for the adenosine triphosphate-dependent proteolytic pathway in reticulocyte maturation. *Science* 215, 978-980.
- Boomker, J. (1980). The haemocytology and histology of the haemopoietic organs of South African Freshwater fish. II. Erythrocytes and thrombocytes of *Clarias gariepinus* and *Sarotherodon mossambicus*. *Onderstepoort J. vet. Res.* 47, 95-100.
- Borg, D.C. & Cotzias, G.C. (1958). Incorporation of manganese into erythrocytes as evidence for an manganese porphyrin in man. *Nature* 182, 1677-1678.
- Borun, E.R., Figueroa, W.G. & Perry, S.M. (1957). The distribution of  $\text{Fe}^{59}$  tagged human erythrocytes in centrifuged specimens as a function of cell age. *J. clin. Invest.* 36, 676-679.

- Bove, J.R. & Ebaugh, F.G. (1958). The use of diisopropyl-fluorophosphate<sup>32</sup> for the determination of in vivo red cell survival and plasma cholinesterase turnover rates. *J. Lab. clin. Med.* 51, 916-925.
- Boyd, E.M., Thomas, D.R., Horton, B.T. & Huisman, T.H.J. (1967). The quantities of various minor hemoglobin components in old and young human red blood cells. *Clin. chim. Acta* 16, 333-341.
- Brunner, A., Bilotta, T.J.A. & Morena, D.D.S. (1983). Mitochondria, hemosomes and hemoglobin biosynthesis. *Cell Tissue Res.* 223, 215-225.
- Catton, W.T. (1951). Blood cell formation in certain teleost fishes. *Blood* 6, 39-60.
- Chapman, R.G. & Schaumburg, L. (1967). Glycolysis and glycolytic enzyme activity of aging red cells in man. *Br. J. Haemat.* 13, 665-678.
- Chudzik, J. & Houston, A.H. (1983). Temperature and erythropoiesis in goldfish. *Can. J. Zool.* 61, 1322-1325.
- Claussen, C.-P. (1985). Cell organelles involved in hemoglobin biosynthesis in vertebrates. In *Functional Morphology in Vertebrates. Proceedings of the 1th Symposium on Vertebrate Morphology* (ed. H.R. Duncker & G. Fleischer). G. Fischer V., Stuttgart, New York.
- Cline, M.J. & Berlin, N.I. (1963). An evaluation of DFP<sup>32</sup> and Cr<sup>51</sup> as methods of measuring red cell life span in man. *Blood* 22, 459-465.

- Cohen, N.S., Ekholm, J.E., Luthra, M.G. & Hanahan, D.J. (1976). Biochemical characterization of density-separated human erythrocytes. *Biochim. biophys. Acta* 419, 229-242.
- Cooke, D., Craven, A.H. & Clarke, G.M. (1984). Basic statistical computing. E. Arnold Publish., London.
- Danon, D. & Marikovsky, Y. (1964). Determination of density distribution of red cell population. *J. Lab. clin. Med.* 64, 668-674.
- Danon, D., Marikovsky, Y. & Gasko, O. (1966). 51-chromium uptake as a function of red cell age. *Lab. clin. Med.* 67, 70-77.
- Deutsch, M. & Engelbert, V.E. (1970). Erythropoiesis through clone cell formation in peripheral blood of the white sucker, *Catostomus commersoni*, studied after labeling with  $^3\text{H}$ -thymidine for various exposure intervals. *Can. J. Zool.* 48, 1241-1250.
- Doan, C.A., Cunningham, R.S. & Sabin, F.R. (1925). Experimental studies on the origin and maturation of avian and mammalian red blood cells. *Contr. Embryol.* 16, 163-226.
- Dombrowski, H. (1953). Untersuchungen über das Blut des Karpfen (*Cyprinus carpio* L.) und einiger anderer Süßwasserfischarten. *Biol. Zbl.* 72, 182-195.
- Drysdale, J.W., Righetti, P. & Bunn, F. (1971). The separation of human and animal hemoglobins by isoelectric focusing in polyacrylamide gel. *Biochim. biophys. Acta* 229, 42-50.
- Duthie, E.S. (1939). The origin, development and function of the blood cells in certain marine teleosts. Part I.

Morphology. *J. Anat.* 73, 396-412.

Ebaugh, F.G., Emerson, C.P. & Ross, J.F. (1953). The use of radioactive chromium 51 as an erythrocyte tagging agent for the determination of red cell survival in vivo. *J. clin. Invest.* 32, 1260-1276.

Ebaugh, F.G. & Ross, J.F. (1985). The radioactive sodium chromate method for erythrocyte survival. *Vox Sang.* 49, 304-307.

Edwards, M.J. & Rigas, D.A. (1961). Electrolyte labile increase of oxygen affinity during in vivo aging of hemoglobin. *J. clin. Invest.* 46, 1579-1588.

Einsele, H., Clemens, M.R. & Remmer, H. (1987). In vitro aging of red blood cells and lipid peroxidation. *Arch. Tox.* 60, 163-166.

Ellis, A.E. (1977). The leucocytes of fish: A review. *J. Fish Biol.* 11, 453-491.

Ellmann, G.L., Courtney, D.K., Andres, V. & Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmac.* 7, 88-95.

Ellory, J.C. & Wolowyk, M.W. (1979). A new density gradient technique for age-separation of human erythrocytes and reticulocytes. *J. Physiol.* 295, 9-10P.

Fänge, R. & Nilsson, S. (1985). The fish spleen: structure and function. *Experientia* 41, 152-158.

Fawcett, D.W. & Witebski, F. (1964). Observations on the ultrastructure of nucleated erythrocytes and thrombocytes,



with particular reference to the structural basis of their discoidal shape. *Z. Zellforsch.* 62, 785-806.

Fey, F. (1965a). Hämatologische Untersuchungen der blutbildenden Gewebe niederer Wirbeltiere. *Folia haemat.* 84, 122-146.

Fey, F. (1965b). Vergleichende Hämozytologie niederer Vertebraten. I. Erythrozyten. *Fol. haemat.* 84, 271-282.

Fink, G.D. & Fisher, J.W. (1977). Stimulation of erythropoiesis by beta adrenergic agonists. I. Characterization of activity in polycythemic mice. *J. Pharmac. exp. Ther.* 202, 192-198.

Fischbeck, K.H., Bonilla, E. & Schotland, D.L. (1982). Freeze-fracture characterization of 'young' and 'old' human erythrocytes. *Biochim. biophys. Acta* 685, 207-210.

Fischer, I. & Walter, H. (1971). Aspartate aminotransferase (GOT) from young and old human erythrocytes. *J. Lab. clin. Med.* 78, 736-746.

Fornaini, G., Leoncini, G., Segni, P., Calabria, G.A. & Dacha, M. (1969). Relationship between age and properties of human and rabbit erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 7, 214-222.

Fornaini, G., Magnani, M., Dacha, M., Bossu, M. & Stocchi, V. (1978). Relationship between glucose phosphorylating activities and erythrocyte age. *Mech. Age. Dev.* 8, 249-256.

Gabryelak, T., Piatkowska, M., Leyko, W. & Peres, G. (1983). Seasonal variations in the activities of peroxide metabolism enzymes in erythrocytes of freshwater fish species. *Comp.*

*Biochem. Physiol.* 75C, 383-385.

Galbraith, D.A. & Watts, D.C. (1980). Changes in some cytoplasmic enzymes from red cells fractionated into age groups by centrifugation in Ficoll/Triosil gradients. *Biochem. J.* 191, 63-70.

Galbraith, D.A. & Watts, D.C. (1981). Human erythrocyte acetylcholinesterase in relation to cell age. *Biochem. J.* 195, 221-228.

Garby, L. & Hjelm, M. (1963). Ultracentrifugal fractionation of human erythrocytes with respect to cell age. *Blut* 9, 284-291.

Gastel, van, C., van den Berg, D., de Grier, J. & van Deenen, L.E.M. (1965). Lipid characteristics of red cells. *Br. J. Haemat.* 11, 1983-1999.

Gershon, H. & Gershon, D. (1970). Detection of inactive enzyme molecules in ageing organisms. *Nature* 227, 1214-1217.

Gillen, R.G. & Riggs, A. (1972). Structure and function of the hemoglobins of the carp, *Cyprinus carpio*. *J. biol. Chem.* 247, 6039-6046.

Glass, G.A. & Gershon, D. (1981). Enzymatic changes in rat erythrocytes with increasing cell and donor age: Loss of Superoxide Dismutase activity associated with increases in catalytically defective forms. *Biochem. biophys. Res. Comm.* 103, 1245-1253.

Glass, G.A. & Gershon, D. (1984). Decreased enzymic protection and increased sensitivity to oxidative damage in erythrocytes as a function of cell and donor aging. *Biochem.*

J. 218, 531-537.

Goebel, K.H., Goebel, F.D., Schuboth, R. & Schneider, J. (1977). Red cell metabolic and membrane features in haemolytic anaemia of alcoholic liver disease (Zieve's Syndrome). *Br. J. Haemat.* 35, 573-583.

Goldstein, B.D., Rozen, M.G. & Kunis, R.L. (1970). Role of red cell membrane lipid peroxidation in hemolysis due to phenylhydrazine. *Biochem. Pharmac.* 29, 1255-1359.

Grujic-Injac, B., Braunitzer, G. & Stangl, A. (1980). Die Sequenz der  $\beta_A$  und  $\beta_B$  Ketten der Hämoglobine des Karpfen (*Cyprinus carpio* L.). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie* 361, 1629-1639.

Grzelinska, E., Bartosz, G. & Bartkowiak, A. (1983). Aging of the erythrocyte. XVIII. Changes in kinetic properties of acetylcholinesterase. *Enzyme* 30, 95-98.

Gurney, C.W. & Fried, W. (1965). Further studies on the erythropoietic effect of androgens. *J. Lab. clin. Med.* 65, 775-782.

Härdig, J. (1977). Maturation of circulating red blood cells in young baltic salmon (*Salmo salar* L.). *Acta physiol. scand.* 178, 290-300.

Haider, G. (1967). Vergleichende Untersuchungen zur Blutmorphologie und Hämatopoese einiger Teleostier. I. Beobachtungen an Zellen der roten Reihe. *Zool. Anz.* 179, 355-384.

Haider, G. (1968). Vergleichende Untersuchungen zur Blutmorphologie und Hämatopoese einiger Teleostier. IV. Blutbildungsstätten und Blutbildung. *Zool. Anz.* 181, 203-226.

- Harris, J.W. & Kellermeyer, R.W. (1972). The red cell. Production, metabolism, destruction: normal and abnormal. 2nd ed., Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass. U.S.A.
- Hattingh, J. (1975). Heparin and ethylenediamine tetraacetate as anticoagulants for fish blood. *Pflügers Arch.* 335, 347-352.
- Heisterkamp, D. & Ebaugh, F.G. (1962). Site of attachment of the chromate ion to the haemoglobin molecule. *Nature* 193, 1253-1255.
- Herz, F., Kaplan, E. & Scheye, E.S. (1968). Differences between the red cell acetylcholinesterase defects of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and of ABO hemolytic disease. *Acta haemat.* 39, 85-90.
- Herz, F. (1975). Acetylcholinesterase inactivation in young and old human red blood cells. *Blut* 31, 17-20.
- Hevesy, G., Lockner, D. & Sletten, K. (1964). Iron metabolism and erythrocyte formation in fish. *Acta physiol. scand.* 60, 256-266.
- Hoffman, J. F. (1958). On the relationship of certain erythrocyte characteristics to their physiological age. *J. cell. comp. Physiol.* 51, 415-423.
- Hughes, G.M., Albers, C., Muster, D. & Götz, K.H. (1983). Respiration of the carp, *Cyprinus carpio* L., at 10 and 20°C and the effects of hypoxia. *J. Fish Biol.* 22, 613-628.
- Huisman, T.H.J. & Dozy, A.M. (1962). Studies on the heterogeneity of hemoglobin. V. Binding of hemoglobin with oxidized glutathione. *J. Lab. clin. Med.* 60, 302-319.



IFCC Section (International Federation of Clinical Chemistry) (1977). Provisional recommendations on IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Pt. 2: IFCC method for aspartate aminotransferase. *Clin. Chem.* 23, 887-899.

Imamura, O. (1979). In *Physiological salines. The formulae for animals from protozoa to vertebrata* (ed. M. Midsukami). p. 227. Keigaku Publish., Tokyo.

Imanishi, H., Nakai, T., Abe, T. & Takino, T. (1986). Glutathione-linked enzyme activities in red cell aging. *Clin. chim. Acta* 159, 73-76.

Ingram, V.M. (1985). Erythropoiesis: Cellular and molecular mechanisms. In *Circulation, Respiration, and Metabolism* (ed. R. Gilles), pp. 322-332. Springer V. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.

Ito, T., Mezawa, K, Okazaki, T. & Shukuya, R. (1984). NADH- and NADPH-dependent reduction of methemoglobin in the nucleated erythrocytes from hen and bullfrog. *Comp. Biochem. Physiol.* 78B, 683-686.

Iuchi, I. & Yamamoto, M. (1983). Erythropoiesis in the developing rainbow trout, *Salmo gairdneri irideus*: Histochemical and immunochemical detection of erythropoietic organs. *J. exp. Zool.* 226, 409-417.

Jacob, H.S. & Jandl, J.H. (1962). Effects of sulfhydryl inhibition on red blood cells. II. Studies in vivo. *J. clin. Invest.* 41, 1514-1522.

Jacob, H.S. & Jandl, J.H. (1966). Effects of sulfhydryl inhibition on red blood cells. III. Glutathione in the

- regulation of the hexose monophosphate pathway. *J. biol. Chem.* 241, 4243-4250.
- Jain, S.K. & Hochstein, P. (1980). Polymerization of membrane components in aging red blood cells. *Biochem. biophys. Res. Comm.* 92, 247-254.
- Jain, S.K., Mohandas, N., Clark, M.R. & Hohet, S. (1983). The effect of malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, on the deformability, dehydration and  $^{51}\text{Cr}$ -survival of erythrocytes. *Br. J. Haemat.* 53, 247-255.
- Jandl, J.H., Engle, L.K. & Allen, D.W. (1960). Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin. I. Heinz body anemias as an acceleration of red cell aging. *J. clin. Invest.* 39, 1818-1836.
- Jelkmann, W. (1986). Erythropoietin research, 80 years after the initial studies by Carnot and Deflandre. *Respir. Physiol.* 63, 257-266.
- Johansson, M.-L., Dave, G., Larsson, A., Lewander, K. & Lidman, U. (1974). Metabolic and hematological studies on the yellow and silver phases of the european eel, *Anquilla anquilla* L.. III. Haematology. *Comp. Biochem. Physiol.* 47B, 593-599.
- Johansson-Sjöbeck, M.-L. (1979). The effects of splenectomy on the haematology and on the activity of delta-aminolae-vulinic acid dehydratase (ALA-D) in haematopoietic tissues of the european eel, *Anquilla anquilla* L.. *Comp. Biochem. Physiol.* 63A, 333-338.
- Jordan, H.E. & Speidel, C.C. (1924). Studies on lymphocytes. II. The origin, function and fate of the lymphocytes in

fishes. *J. Morph.* 38, 529-549.

Jordan, H.E. (1933). The evolution of blood forming tissues. *Q. Rev. Biol.* 8, 58-76.

Kampen, van, E.J. & Zijlstra, W.G. (1961). Standardization of hemoglobinometry. II. The hemiglobincyanide method. *Clin. chim. Acta* 6, 538-544.

Kanesada, A. (1956). A phylogenetical survey of hemocytopoietic tissues in submammalian vertebrates. *Bull. Yamaguchi med. School* 4 (No 1), 1-21.

Kassenaar, A., Morell, H. & London, I.M. (1957). The incorporation of glycine into globin and the synthesis of heme in vitro in duck erythrocytes. *J. biol. Chem.* 229, 423-435.

Kay, M.M.B., Goodman, S.R., Sorensen, K., Whitfield, L.F., Wong, P., Zaki, L. & Rudloff, V. (1983). Senescent cell antigen is immunologically related to band 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1631-1635.

Kirkpatrick, F.H., Muhs, A.G., Kostik, R.K. & Gabel, C.W. (1979). Dense (aged) circulating red cells contain normal concentrations of adenosine triphosphate (ATP). *Blood* 54, 946-950.

Koutras, G.A., Schneider, A.S., Hattori, M. & Valentine, W.N. (1965). Studies on chromated erythrocytes: Mechanisms of chromate inhibition of glutathione reductase. *Br. J. Haemat.* 11, 360-369.

Kreutzmann, H.-L. (1976). Untersuchungen zur Morphologie des Blutes vom europäischen Aal (*Anquilla anquilla*). I. Die

Erythrozyten und ihre Entwicklungsstadien. *Folia haemat.* 103, 226-235.

Kreutzmann, H.-L. & Jonas, L. (1978). Elektronenmikroskopische und ultrahistochemische Untersuchungen der Erythrozyten vom Aal (*Anquilla anquilla*) und von der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri*) unter besonderer Berücksichtigung des Segregationsapparates und des Marginalbandes. *Acta histochem.* 62, 282-292.

Krzymowska, H., Iwanska, S. & Winnicki, A. (1960). The effect of the erythropoietic factor from sheep plasma on erythropoiesis in carps (*Cyprinus carpio* L.). *Acta physiol. pol.* 11, 425-431.

Lane, H.C. & Tharp, T.P. (1980). Changes in the population of polyribosomal containing red cells of peripheral blood of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, following starvation and bleeding. *J. Fish Biol.* 17, 75-81.

Lane, H.C., Weaver, J.W., Benson, J.A. & Nichols, H.A. (1982). Some age related changes of adult rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich., peripheral erythrocytes separated by velocity sedimentation at unit gravity. *J. Fish Biol.* 21, 1-13.

Lane, H.C. (1984). Nucleoside triphosphate changes during the peripheral life-span of erythrocytes of adult rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. exp. Zool.* 231, 57-62.

Lewis, U.J. (1954). Acid cleavage of heme proteins. *J. biol. Chem.* 206, 109-120.

Lindena, J., Wittenberg, H., Diederichs, F. & Trautschold I. (1986). The decline of catalytic enzyme activity



concentration of in vivo ageing erythrocytes of the man, the dog and the rat. *J. clin. Chem. clin. Biochem.* 24, 49-59.

Linman, J.W. (1975). Haematology. Physiologic, pathophysiologic, and clinical principles. Macmillan Publ., New York.

Löhr, G.W., Waller, H.D., Karges, D., Schlegel, B. & Müller, A. (1958). Zur Biochemie der Alterung menschlicher Erythrozyten. *Klin. Wschr.* 36, 1008-1013.

Löhr, G.W. & Waller, H.D. (1962). Zur Biochemie der Erythrozytenalterung. *Folia haemat.* 78, 385-402.

Lockwood, A.P.M. (1961). Ringer solutions and some notes on the physiological basis on their ionic composition. *Comp. Biochem. Physiol.* 2, 241-289.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* 193, 265-275.

Maehly, A.C. & Chance, B. (1964). The assay of catalases and peroxidases. In *Methods of biochemical analysis* Vol I, 3. ed. (ed. D. Glick), pp. 357-424. Interscience Publ. Inc., New York.

Magnani, M., Stocchi, V., Bossu, M., Dacha, M. & Fornaini, G. (1979). Decay pattern of rabbit erythrocyte hexokinase in cell aging. *Mech. Age. Dev.* 11, 209-217.

Magnani, M., Piatti, E., Serafini, N., Palma, F., Dacha, M. & Fornaini, G. (1983). The age-dependent metabolic decline of the red blood cell. *Mech. Age. Dev.* 22, 295-308.

Mahajan, C.L., Dheer, J.M.S. (1980). The autoradiographic and

cytochemical study of erythropoiesis in a fresh water fish, *Channa punctatus* Bloch. *J. Fish Biol.* 17, 641-648.

Marks, P.A., Johnson, A.B. & Hirschberg, E. (1958). Effect of age on the enzyme activity in erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 44, 529-536.

Maximow, A. (1924). The relation of blood cells to connective tissue and endothelium. *Physiol. Rev.* 4, 533-563.

Mbemba F., Houbion, A., Raes, M. & Remacle, J. (1985). Subcellular localization and modification with ageing of glutathione, glutathione peroxidase and glutathione reductase activities in human fibroblasts. *Biochim. biophys. Acta* 838, 211-220.

Metz, J., Stevens, K., Rensburg, van, N.J. & Hart, D. (1961). Failure of in vivo-inhibition of acetylcholinesterase to affect erythrocyte life-span: The significance of the enzyme defect in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Br. J. Haemat.* 7, 458-463.

Misra, H.P. & Fridovich, I. (1972). The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J. biol. Chem.* 247, 6960-6962.

Miwa, S. (1979). Significance of the determination of red cell enzyme activities. *Am. J. Haemat.* 6, 163-172.

Mohandas, N., Kim, Y.R., Tycko, D.H., Orlik, J., Wyatt, J. & Groner, W. (1986). Accurate and independent measurement of volume and hemoglobin concentration of individual red cells by Laser Light Scattering. *Blood* 68, 506-513.

- Morell, H., Savoie, J.C. & London, I.M. (1958). The biosynthesis of heme and the incorporation of glycine into globin in rabbit bone marrow in vitro. *J. biol. Chem.* 233, 923-929.
- Morrison, M., Jackson, C.W., Mueller, T.J., Huang, T., Dockter, M.E., Walker, W.S., Singer, J.A. & Edwards, H.H. (1983). Does cell density correlate with red cell age? *Biomed. biochim. Acta* 42, 107-111.
- Munn, J.I. & Crosby, W.H. (1961). Red cell lipids in various abnormalities of the human red cell. *Br. J. Haemat.* 7, 523-528.
- Murachi, S. (1959). Hemoglobin content, erythrocyte sedimentation rate and hematocrit of the blood in the young of the carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Fac. Fish. Anim. Husb. Hiroshima Univ.* 2, 241-247.
- Murphy, J.R. (1973). Influence of temperature and method of centrifugation on the separation of erythrocytes. *J. Lab. clin. Med.* 82, 334-341.
- Nakao, M., Nakao, T. & Yamazoe, S. (1960). Adenosine triphosphate and maintenance of shape of the human red cell. *Nature* 187, 945-946.
- Onate, S., Amthauer, R. & Krauskopf, M. (1987). Differences in the t-RNA population between summer and winter acclimatized carp. *Comp. Biochem. Physiol.* 86B, 663-666.
- Orgel, L.E. (1963). The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 49, 517-521.

- Ott, P., Jenny, B. & Brodbeck, U. (1975). Multiple molecular forms of purified human erythrocyte acetylcholinesterase. *Eur. J. Biochem.* 57, 469-480.
- Parker, J.C. (1973). Dog red blood cells. Adjustment of density in vivo. *J. gen. Physiol.* 61, 146-157.
- Pearson, H.A. (1963). The binding of  $\text{Cr}^{51}$  to hemoglobin. I. In vitro studies. *Blood* 22, 218-230.
- Peisach, J., Blumberg, W.I.E., Wittenberg, B.A. & Wittenberg, J.B. (1968). The electronic structure of protoheme proteins. III. Configuration of the heme and its ligands. *J. biol. Chem.* 243, 1871-1880.
- Penner, J.A. (1966). Investigation of erythrocyte turnover with selenium-75-labeled methionine. *J. Lab. clin. Med.* 67, 427-438.
- Pfeffer, S.R. & Swislocki, N.I. (1976). Age-related decline in the activities of erythrocyte membrane adenylate cyclase and protein kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 177, 117-122.
- Piomelli, S., Lurinsky, G. & Wasserman, L.R. (1967). The mechanism of red cell aging. I. Relationship between cell age and specific gravity evaluated by ultracentrifugation in a discontinuous density gradient. *J. Lab. clin. Med.* 69, 659-674.
- Piomelli, S., Seaman, C. & Corash, L. (1986). Correspondence. How do red cell enzymes age? Hypothesis and facts. *Br. J. Haemat.* 64, 407-408.
- Politzer, P. (1968). A charge transfer interpretation of the interactions of hemoglobin with oxygen and carbon monoxide.



- Biochim. biophys. Acta* 153, 799-803.
- Pranker, T.A.J. (1958). The ageing of red cells. *J. Physiol.* 143, 325-331.
- Prentice, T.C. & Bishop, C. (1965). Separation of rabbit red cells by density methods and characteristics of separated layers. *J. cell. comp. Physiol.* 65, 113-126.
- Rapoport, S.M., Rosenthal, S., Schewe, T., Schultze, M. & Miller, M. (1974). The metabolism of the reticulocyte. In *Cellular and molecular Biology of Erythrocytes* (ed. H. Yoshikawa & S.M. Rapoport), pp. 93-141. Urban & Schwarzenberg, München, Berlin, Wien.
- Rapoport, S.M. (1985). Mechanisms of the maturation of the reticulocyte. In *Circulation, Respiration, and Metabolism* (ed. R. Gilles), pp. 333-342. Springer V., Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- Rigas, D.A. & Koler, R.D. (1961). Ultracentrifugal fractionation of human erythrocytes on the basis of red cell age. *J. Lab. clin. Med.* 58, 242-246.
- Riggs, A. (1981). Preparation of blood hemoglobins of vertebrates. In *Methods in Enzymology* (ed. E. Antonini, L. Rossi-Bernardi, E. Chioncone) Vol. 76, pp. 5-29. Ac. Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco.
- Rosa, J., Dreyfus, J.C. & Schapira, G. (1960). Ageing of haemoglobin. *Nature* 188, 753-754.
- Rosse, W.F., Waldmann, T. & Hull, E. (1963). Factors stimulating erythropoiesis in frogs. *Blood* 22, 66-72.

- Rosse, W.F. & Waldmann, T. (1966). Factors controlling erythropoiesis in birds. *Blood* 27, 654-661.
- Rossi Fanelli, A., Antonini, E. & Caputo, A. (1958). Studies on the structure of hemoglobin. I. Physicochemical properties of human globin. *Biochim. biophys. Acta* 30, 608-615.
- Sachs, L. (1984). *Angewandte Statistik*. Springer V., Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- Sadana, A. & Henley, J.P. (1985). A mathematical analysis of the influence of aging on enzyme activation kinetics. *Mech. Age. Dev.* 32, 113-130.
- Saez, L., Goichoechea, O., Amthauer, R. & Krauskopf, M. (1982). Behaviour of RNA and protein synthesis during the acclimatization of the carp. Studies with isolated hepatocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* 72B, 31-38.
- Samarut, J. (1978). Isolation of an erythropoietic stimulating factor from the serum of anemic chicks. *Expl. Cell. Res.* 115, 123-126.
- Sass, M.D., Vorsanger, E. & Spear, P.W. (1964). Enzyme activity as an indicator of red cell age. *Clin. chim. Acta* 10, 21-26.
- Schindler, J.F., de Vries, U. & Lindner, E. (1985). Microspectrophotometric and scanning microphotometric studies of carp (*Cyprinus carpio* L.) erythrocytes. *Histochemistry* 82, 483-489.
- Schindler, J.F. & de Vries, U. (1986). Scanning cytophotometry of carp, *Cyprinus carpio* L., erythrocyte populations: the influence of short-term hypoxic environment and the

recovery period following severe bleeding. *J. Fish Biol.* 28, 741-752.

Scott, E.M. & Harrington, J.P. (1985). Methemoglobin reductase activity in fish erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* 82B, 511-513.

Seaman, G.V.F., Knox, R.J., Nordt, F.J. & Regan, D.H. (1977). Red cell aging. I. Surface charge density and sialic acid content of density-fractionated human erythrocytes. *Blood* 50, 1001-1011.

Seaman, C., Wyss, S. & Piomelli, S. (1980). The decline in energetic metabolism with aging of the erythrocyte and its relationship to cell death. *Am. J. Haemat.* 8, 31-42.

Sears, D.A. & Weed, R.I. (1969). Diisopropylfluorophosphate is not a specific label for the red cell membrane. *Blood* 34, 376-379.

Sekhon, S.S. & Beams, H.W. (1969). Fine structure of the developing trout erythrocytes and thrombocytes with special reference to the marginal band and the cytoplasmic organelles. *Am. J. Anat.* 125, 353-374.

Shemin, D. & Rittenberg, D. (1964a). The biological utilization of glycine for the synthesis of the protoporphyrin of hemoglobin. *J. biol. Chem.* 166, 621-626.

Shemin, D. & Rittenberg, D. (1964b). The life span of the human red blood cell. *J. biol. Chem.* 166, 627-636.

Skau, K.A. (1985). Acetylcholinesterase molecular forms in serum and erythrocytes of laboratory animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 80C, 207-210.

Smith, C., Lewis, W. & Kaplan, H.M. (1952). A comparative morphologic and physiologic study of fish blood, *Progre. Fish Cult.* 14, 169-172.

Smith, G.L. & Hattingh, J. (1980). Haematological assessment of generally used freshwater fish blood anticoagulants. *J. Fish Biol.* 17, 337-341.

Soivio, A., Nyholm, K. & Westman, K. (1975). A technique for repeated sampling of the blood of individual resting fish. *J. Fish Biol.* 62, 207-217.

Srivastava, A.K. (1968). Studies on the hematology of certain freshwater teleosts. I. Erythrocytes. *Anat. Anz.* 183, 233-249.

Syllm-Rapoport, I., Jacobasch, G., Prehn, S. & Rapoport, S. (1969). On a regulatory system of the adenine level in the plasma connected with red cell maturation and its effect on the adenine nucleotides of the circulating erythrocyte. Lack of relation between ATP level and life span of the erythrocyte. *Blood* 33, 617-627.

Tannert, Ch., Schmidt, G., Klatt, D. & Rapoport, S.M. (1977). Mechanism of senescence of red blood cells. *Acta biol. med. germ.* 36, 831-836.

Tilley, P.A.G., Watson, T.A. & Mc Keown, B.A. (1981). The absence of acetylcholinesterase in various blood preparations of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Comp. biochem. Physiol.* 69C, 125-127.

Topf, W. (1953). Über die Blutbildung und die Blutbildungsstätten beim Karpfen (*Cyprinus carpio* L.). *Zool. Anz.* 150, 91-104.



Trautsch, Ch., Tannert, C. & Maretzki, D. (1981). Disproportional loss of membrane constituents in the course of erythrocyte aging. *Acta biol. med. germ.* 40, 743-746.

Turner, B.M., Fisher, R.A. & Harris, S.H. (1974). The age related loss of four enzymes in the human erythrocyte. *Clin. chim. Acta* 50, 85-95.

Varo, M.I. (1970). Die Bildung der Blutzellen bei *Cyprinus carpio* L.. *Rev. roum. Biol. (Zool.)* 15, 141-145.

Viale, R.O., Maggiora, G.M. & Ingraham, L.L. (1964). Molecular orbital evidence for Weiss's oxyhemoglobin structure. *Nature* 203, 183-184.

Vries, de, U. & Schindler, J.F. (1984). A simplified procedure for correction of errors in scanning absorbance cytophotometry. *J. Microsc.* 136, 361-365.

Waller, H.D., Birke, G., Tigges, F.-J. & Benöhr, H.C. (1974). Glutathiongehalt und Glutathion reduzierende Enzyme in Erythrozyten verschiedenen Alters. *Klin. Wschr.* 52, 179-184.

Walsh, R.J., Thomas, E.D., Chow, S.K., Fluharty, R.G. & Finch, C.A. (1949). Iron metabolism: Heme synthesis in vitro by immature erythrocytes. *Science* 110, 396-398.

Walsh, A.H. (1984). Biology and diseases of fish. In *Laboratory animal medicine* (ed. Fox, Cohen, & Loew), pp. 477-503. Ac. Press, New York.

Walter, H. (1963). Chemical reactivity of a macromolecule as a function of its age. *Biochim. biophys. Acta* 69, 410-411.

- Wdzieczak, J., Zalesna, G., Wujec, E. & Peres, G. (1982). Comparative studies on superoxide dismutase, catalase and peroxidase levels in erythrocytes and livers of different freshwater and marine fish species. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B, 361-365.
- Weber, R.E. & Lykkeboe, G. (1978). Respiratory adaptations in carp blood. Influences of hypoxia, red cell organic phosphates, divalent cations and CO<sub>2</sub> on hemoglobin-oxygen affinity. *J. comp. Physiol.* 128, 127-137.
- Weinberg, S.R., Siegel, C.D. & Gordon, A.S. (1973). Studies on the peripheral blood cell parameters and morphology of the red paradise fish, *Macropodus opercularis*. Effect of food deprivation on erythropoiesis. *Anat. Rec.* 175, 7-13.
- Weinreb, E.L. (1963). Studies on the fine structure of teleost blood cells. I. Peripheral blood. *Anat. Rec.* 147, 219-238.
- Weiss, J.J. (1964). Nature of the iron-oxygen bond in oxyhemoglobin. *Nature* 202, 83-84.
- Wilton, A. (1966). An attempt to separate erythrocytes according to age by a new type of centrifuge. *Acta haemat.* 35, 163-175.
- Wolowyk, M.W. (1982). Cell separation techniques. In *Red cell membranes - a methodological approach* (ed. J. C. Ellory & J. D. Young), pp. 1-11. Ac. Press, New York, London.
- Wurm, T. (1988). Die Wechselwirkung allosterischer Effektoren (H<sup>+</sup>, ATP, CO<sub>2</sub>) und deren Einfluß auf die Sauerstoffaffinität des Karpfenhämoglobins. Dissertation, Universität Regensburg.

- Yamamoto, M. & Iuchi, I. (1976). Electron microscopic study of erythrocytes in developing rainbow trout, *Salmo gairdnerii irideus*, with particular reference to changes in the cell line. *J. exp. Zool.* 191, 407-426.
- Yamamoto, K.-I., Itazawa, Y. & Kobayashi, H. (1980). Supply of erythrocytes into the circulating blood from the spleen of exercised fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 56A, 5-11.
- Yasuzumi, G. & Higashizawa, S. (1955). Submicroscopic structure of the carp erythrocyte as revealed by electron microscopy. *Cytologia* 20, 280-290.
- Yoffee, J.H. (1929). A contribution to the study of the comparative histology and physiology of the spleen with reference chiefly to its cellular constituents. I. In fishes. *J. Anat.* 63, 314-344.
- Zanjani, E.D., Yu, M.-L., Perlmutter, A. & Gordon, A.S. (1969). Humoral factors influencing erythropoiesis in the fish (Blue Gourami - *Trichogaster trichopterus*). *Blood* 33, 573-581.
- Zanjani, E.D., Gordon, A.S., Gidari, A.S. & Kuna, R.A. (1973). Regulation of erythropoiesis in lower vertebrates. In *Humoral control of growth and differentiation I* (ed. J. Lobue & A.S. Gordon), pp. 165-182. Ac. Press, New York, London.
- Zapata, A. & Carrato, A. (1981). Ultrastructure of elasmobranch and teleost erythrocytes. *Acta zool.* 62, 129-135.



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1985 bis Januar 1988 am Lehrstuhl für Physiologie I der Naturwissenschaftlichen Fakultät III - Biologie und Vorklinische Medizin - der Universität Regensburg erstellt.

Teile dieser Arbeit wurden anlässlich der Tagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft vom 17.-21.3. 1987 in Homburg/Saar (64. Kongreß) unter dem Titel "MCH in Carp Depends on Age of Red Cells" (Pflügers Arch. Eur. J. Physiol. 408 S1) vorgestellt.

Herrn Prof. Dr. med. C. Albers danke ich für die Überlassung der Arbeitsmittel, die Auswahl des Themas und der damit in Verbindung stehenden vielfältigen Diskussionen.

Fräulein M. Hamann, Frau H. Trommer, Herrn B. Geß und Herrn K.H. Götz danke ich für die technische Unterstützung und ihre tatkräftige Mithilfe bei den Versuchen.

